

Untersuchung von Mykobakteriophagen- Lysinen als antimykobakterielle Wirkstoffe



Universität Regensburg



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT III – BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN – DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
Robert Andreas Fischer

aus
Ingolstadt

im Jahr
2016

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 13.01.2016

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Reinhard Sterner (Universität Regensburg)

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Rainer Merkl

1. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Sterner

2. Prüfer: Prof. Dr. Hans-Robert Kalbitzer

3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Wirth

Ersatzprüferin: Prof. Dr. Christine Ziegler

Robert Andreas Fischer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2013 bis Dezember 2015 am Lehrstuhl Biochemie II des Institutes für Biophysik und physikalische Biochemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner in Kooperation mit der Lisando GmbH Regensburg unter Betreuung von Herrn Dr. Stefan Miller und Herrn Prof. Dr. Rainer Merkl angefertigt. Von Januar 2013 bis Dezember 2015 erfolgten Arbeiten bei der Lisando GmbH Regensburg.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	1
1. Einleitung.....	3
1.1. Die Gattung <i>Mycobacterium</i>	3
1.2. Relevanz der Gattung <i>Mycobacterium</i> für den Menschen.....	6
1.3. Mykobakteriophagen	8
1.4. Die Enzyme Lysin A und Lysin B der lytischen Kassette von Mykobakteriophagen	10
1.5. Phagen Lysine als antibakterielle Wirkstoffe	12
1.6. Zielsetzung der Doktorarbeit.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Material	14
2.1.1. Geräte und Software	14
2.1.2. Verbrauchsmaterial und Chemikalien	19
2.1.3. Enzyme	20
2.1.4. Kits	20
2.1.5. Vektoren.....	21
2.1.6. Primer	21
2.1.7. Längen- und Molekulargewicht- Standards	21
2.1.8. Lösungen und Puffer	22
2.1.9. Nährmedien.....	26
2.1.10. Bakterienstämme	27
2.2. Methoden.....	28
2.2.1. Anzucht und Lagerung der verwendeten Stämme	28
2.2.2. Gentechnologische Erzeugung der benötigten Expressionsvektoren	28
2.2.2.1. DNA Amplifikation per Polymerase-Kettenreaktion	28
2.2.2.2. Quick-Change Mutagenese	29
2.2.2.3. Agarosegel-Elektrophorese und Isolierung der DNA aus den Agarosegelen	30
2.2.2.4. Restriktionsverdau der DNA und folgende Ligation der gereinigten Verdauprodukte	30
2.2.2.5. Chemische Transformation	31

2.2.2.6.	Plasmid Präparation aus <i>E. coli</i>	32
2.2.3.	Rekombinante Proteinexpression	32
2.2.4.	Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine	32
2.2.4.1.	Zellaufschluss, Überstandsklärung und His-Tag Affinitätschromatographie	32
2.2.4.2.	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western Blot	34
2.2.5.	Charakterisierung der rekombinant hergestellten Proteine	35
2.2.5.1.	Nah-UV-Spektroskopie	35
2.2.5.2.	Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie	36
2.2.5.3.	Analytische Gelfiltrationschromatographie	38
2.2.5.4.	Fluorescence based Thermal Shift Assay (FTSA)	39
2.2.5.5.	Nano DSF	40
2.2.6.	Bioinformatische Vorhersage thermisch stabilisierender D29gp12-Mutanten	40
2.2.7.	Bestimmung der <i>in vitro</i> Enzymaktivität	40
2.2.7.1.	Chloroform Test: Bestimmung der Lysin A Aktivität	40
2.2.7.2.	Esterase-Aktivitätstest: Bestimmung der Lysin B Aktivität	41
2.2.8.	Bestimmung der Aktivität auf lebenden Mykobakterien	42
2.2.8.1.	Standard-Aktivitätstest: Bestimmung der Lebendkeimzahl unter Verwendung serieller Verdünnungen	42
2.2.8.2.	Bestimmung der Reportergen-Kopienzahl mittels PMA-basierter PCR-Inhibition und qPCR	43
2.2.8.3.	Quantifizierung der stoffwechselaktiven Zellen mittels Luziferase-basiertem ATP-Nachweis	45
2.2.8.4.	Bestimmung der <i>minimal-inhibitory-concentration</i> (MIC): Wachstumsinhibitionsnachweis mittels Resazurin-Reduktion	45
2.2.8.5.	Wachstumsinhibitionsnachweis mittels BactecMGIT 960-System	47
2.2.8.6.	Lichtmikroskopie	48
2.2.8.7.	BacLight-Vitalitäts-Zellfärbung und Fluoreszenzmikroskopie	48
2.2.8.8.	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)	48
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Gentechnologische Arbeiten und Produktion der rekombinanten Proteine	50
3.1.1.	Herstellung der Zielprotein-codierenden Expressionsvektoren	50
3.1.2.	Rekombinante Expression und affinitätschromatographische Reinigung der Proteine	51
3.2.	Biophysikalische Charakterisierung ausgewählter Lysine	58
3.2.1.	Nah-UV-Spektroskopie	58
3.2.2.	CD-Spektroskopie	59
3.2.3.	Analytische Gelfiltrationschromatographie	60
3.2.4.	Optimierung der Reinigungs- und Lagerungspuffer	64
3.2.4.1.	FTSA Experimente zur Optimierung des Puffersystems und zur Überprüfung des Einflusses verschiedener Natriumchlorid-Konzentrationen	64
3.2.4.2.	Optimierung des Lagerungspuffers mittels Lysin B <i>in vitro</i> Restaktivitätsuntersuchungen	65

3.2.5.	Thermische Stabilisierung von Lysin B D29gp12 mittels Mutagenese	66
3.2.6.	NanoDSF Untersuchung des Einflusses der Fusion von Lysin B D29gp12 mit dem Peptid pK34 auf die thermische Stabilität	68
3.3.	Bestimmung der <i>in vitro</i> Aktivität der rekombinant hergestellten Lysine	69
3.3.1.	Bestimmung der Aktivität auf nicht-nativem Substrat.....	69
3.4.	Einfluss des pH-Wertes und der Natriumchloridmolarität auf die <i>in vitro</i> Aktivität der Lysine B	71
3.4.1.	Einfluss der Fusion aus Lysin B und Peptid auf die <i>in vitro</i> Esterase-Aktivität	73
3.5.	Aktivität von ausgewählten Lysinen A, Lysinen B und Artilysinen auf lebenden Mykobakterien	74
3.5.1.	Bestimmung der Reduktion der Koloniebildenden Einheiten unter Verwendung des Standard-Aktivitätstestes.....	74
3.5.2.	BactecMGIT 960 basierter Nachweis der Wachstumsinhibition	76
3.5.3.	Quantifizierung von stoffwechselaktiven Zellen mit einem Luciferase-basierten ATP Nachweis	78
3.5.4.	Bestimmung der Reporter-gen-Kopienzahl mittels PMA-basierter PCR-Inhibition und qPCR	79
3.5.5.	Bestimmung der <i>minimal-inhibitory-concentration</i> (MIC) mittels Resazurin-Reduktion	80
3.5.6.	Lebend- Tot- Zell-Diskriminierung durch Fluoreszenzmikroskopie	82
3.5.7.	Visualisierung des antimykobakteriellen Effektes mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie	85
4.	Diskussion.....	87
4.1.	Endolysine als antibakterielle Wirkstoffe und Auswahl der Lysine	87
4.2.	Auswahl der antimikrobiellen Peptide (AMP) für die Entwicklung von Artilysinen	91
4.3.	Expression und Reinigung der Lysine	92
4.4.	<i>in vitro</i> Aktivitätsbestimmung und Charakterisierung	95
4.5.	Mutagenese für die thermische Stabilisierung von D29gp12	101
4.6.	Nachweis der antimykobakteriellen Aktivität	103
4.7.	Bestimmung der <i>minimal-inhibitory-concentration</i> (MIC) auf <i>M. smegmatis</i>	107
4.8.	Visualisierung des Effektes der Lysine bzw. Artily sine auf die mykobakteriellen Zellen	111
4.9.	Zentrale Aussage und Ausblick	113
5.	Referenzen	116
6.	Anhang	125
	Anhang 1: Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	125
	Anhang 2: Sequenzen und Beschreibung ausgewählter Primer.....	127
	Anhang 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Lysine	130
	Anhang 4: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der verwendeten antimikrobiellen Peptide	131
	Anhang 5: Mutagenesevarianten von D29gp12	132
	Anhang 6: Residuen H177 und G184 in der Kristallstruktur des Lysins B D29gp12	133
	Anhang 7: Protein- <i>sequencealignments</i> der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, L5gp10 und TM4gp29.....	134
	Anhang 8: Protein- <i>sequencealignments</i> der Lysine B Bxz2gp12, D29gp12, L5gp12 und TM4gp30.....	136

Anhang 9: Ermittlung einer geeigneten Proteinmolarität für die Bestimmung der antimykobakteriellen Aktivität mit dem Standard-Aktivitätstest	137
Anhang 10: MIC-Werte verschiedener Endolysine und Lysine A	138
Anhang 11: Effekt der weiteren Zugabe von 0,05 % v/v Tween 80 bzw. 0,002 % v/v Triton X-100 auf die <i>in vitro</i> Aktivität des Lysins B D29gp12	139
7. Danksagung	140
8. Eidesstattliche Erklärung.....	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: (a) Phylogenetischer Baum der Ordnung Actinomycetales basierend auf der 16S rRNA; modifiziert nach Ventura et al., 2006; (b) Phylogenetischer Baum der verschiedenen Abstammungslinien der Gattung <i>Mycobacterium</i> ; modifiziert nach Veyrier et al., 2009; (c) Raster-Elektronen-Mikroskopische Aufnahme von <i>M. smegmatis</i> ; modifiziert nach Lai M. J. et al., 2015.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellhülle von <i>M. tuberculosis</i> ; modifiziert nach Abdallah A. M. et al., 2007 (oben) und des Aufbaus des mykobakteriellen Peptidoglykans; modifiziert nach Kieser K. J. und Rubin E. J., 2014 (unten)	4
Abbildung 3: Stadien der Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> (Rook G. A. et al., 2005)	6
Abbildung 4: Darstellung des lytischen und des lysogenen Replikationszyklus von Bakteriophagen; modifiziert nach Sturino J. M. und Klaenhammer T. R., 2006.....	8
Abbildung 5: Beispiele der Morphologie von Mykobakteriophagen; modifiziert nach Hatfull G. F., 2014.....	9
Abbildung 6: Angriffspunkte von Lysin A und Lysin B der lytischen Kassette der Mykobakteriophagen; modifiziert nach Payne K. et al., 2009.....	11
Abbildung 7: Chromatogramm der His-Tag Affinitätschromatographie von Lysin B D29gp12-H.....	52
Abbildung 8: (a) SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der affinitätschromatographischen Reinigung des Lysin B D29gp12-H, (b) Western Blot einer 1 µM Lösung von D29gp12-H	53
Abbildung 9: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der affinitätschromatographischen Reinigung des Lysin B Bxz2gp12-H	54
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Nah-UV Spektren der Proteine D29gp10-H (links) und D29gp12-H (rechts)	59
Abbildung 11: CD-Spektren der Lysine A, der Lysin A Varianten ohne CBD und der Lysine B.....	60
Abbildung 12: Überlagerung der analytischen Gelfiltrationschromatographie-Läufe der Lysine A und der CBD Deletionsvarianten; (a) Bxz2gp11-H und H-Bxz2gp11ΔCBD, (b) D29gp10-H und H-D29gp10ΔCBD und (c) TM4gp29-H und H-TM4gp29ΔCBD	62
Abbildung 13: Überlagerung der analytischen Gelfiltrationschromatographie-Läufe der Proteine D29gp10-H, D29gp12-H und der Mischung von D29gp10-H und D29gp12-H.....	63
Abbildung 14: (a) Denaturierungskurve des Artilylins D29gp12-H-pK34; (b) Überlagerung der ersten Ableitung der gemessenen nanoDSF-Schmelzkurven des Lysin B D29gp12-H und der Artilylins B D29gp12-H-pK34 und pK34-D29gp12-H	68
Abbildung 15: Chloroform-Test zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Lysine A auf Peptidoglykan von <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	70

Abbildung 16: Esterase-Aktivitätstest für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Lysine B auf 4-Nitrophenylacetat als Substrat.....	71
Abbildung 17: Esterase-Aktivitätstests zur Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes und der Natriumchloridmolarität	72
Abbildung 18: BacLight Lebend-Tot-Zelldiskriminierung der <i>M. smegmatis</i> SMR5 Proben	83
Abbildung 19: BacLight Lebend-Tot-Zelldiskriminierung der <i>M. fortuitum</i> Proben.....	84
Abbildung 20: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie der antimykobakteriellen Wirkung	86
Abbildung 21: (a) Domänenstruktur der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, L5gp10 und TM4gp29; (b) Peptidoglykan-Schnittstellen der enzymatisch aktiven Domänen (EAD) der Lysine A; modifiziert nach Payne K. M. and Hatfull G. F., 2012	89
Abbildung 22: Darstellung der Hydrophobizität und Hydrophilie auf der Oberfläche des Lysin B D29gp12.....	94
Abbildung A 1: D29gp12-H Aminosäuresequenz und der veränderten Residuen	132
Abbildung A 2: Darstellung der aus den Mutageneseuntersuchungen erhaltenen Residuen mit stabilisierendem Effekt.....	133
Abbildung A 3: <i>Alignment</i> der Aminosäuresequenzen der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, L5gp10 und TM4gp29.....	134
Abbildung A 4: <i>Alignment</i> der Aminosäuresequenzen der Lysine B Bxz2gp12, D29gp12, L5gp12, Ms6gp3 und TM4gp30.....	136
Abbildung A 5: Esterase-Aktivitätstest für die Bestimmung des Einflusses der Zugabe von 0,05 % ν / ν Tween 80 bzw. 0,002 % ν / ν Triton X-100 auf die enzymatische Aktivität des Lysins B D29gp12 auf das Substrat 4-Nitrophenylacetat	139

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Vektoren	21
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	27
Tabelle 3: Tabellarische Darstellung des Programmes für die PCR-Reaktionen	29
Tabelle 4: Zusammensetzung des PCR-Reaktions-Ansatzes	29
Tabelle 5: Zusammensetzung des Restriktions-Verdau-Ansatzes	31
Tabelle 6: Zusammensetzung des Ligations-Ansatzes	31
Tabelle 7: Tabellarische Darstellung des Ultraschall-Zellaufschluss Programmes	33
Tabelle 8: Zusammensetzung der <i>Thermal Shift Fluorescence Assay</i> Ansätze	39
Tabelle 9: Verwendete Umrechnungsfaktoren für die mykobakteriellen Kulturen: Umrechnung der optischen Dichte in Zellzahl pro Milliliter	43
Tabelle 10: Parameter der Bestimmung der Resorufin-Fluoreszenzintensität	47
Tabelle 11: Übersicht der Lysin-codierenden und Artilysin-codierenden Expressionsvektoren	51
Tabelle 12: Ausbeuten nach affinitätschromatographischer Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine	57
Tabelle 13: Ausgewählte Schmelzpunkte der FTSA Experimente zur Optimierung des Puffersystems	64
Tabelle 14: Schmelzpunkte aus dem FTSA Experimenten zur Bestimmung des Einflusses der Natriumchloridmolarität auf die thermische Stabilität der ausgewählten Lysine	64
Tabelle 15: Einfluss des Puffers und der Temperatur auf die relative Abnahme der Aktivität der Lysine B Bxz2gp12 und D29gp12 nach 21 bzw. nach 55 Tagen Lagerung	65
Tabelle 16: Schmelzpunkte und relative Aktivitäten der D29gp12-Varianten	67
Tabelle 17: Relative <i>in vitro</i> Aktivitäten der Bxz2gp12- und D29gp12-Artilyisine	73
Tabelle 18: Zeitabhängigkeit der antimykobakteriellen Wirkungen auf <i>M. smegmatis</i> SMR5	74
Tabelle 19: Standard-Aktivitätstest der KBE Reduktion auf <i>M. smegmatis</i> SMR5	75
Tabelle 20: Standard-Aktivitätstest der KBE Reduktion auf <i>M. fortuitum</i>	76
Tabelle 21: Darstellung der in den BactecMGIT Experimenten erhaltenen Wachstumsdetektionszeiten	77
Tabelle 22: Ergebnisse des Luciferase-basierten ATP-Nachweises	79
Tabelle 23: Relative Kopienzahl des Reportgens <i>hsp65</i>	80
Tabelle 24: <i>minimal-inhibitory-concentration</i> gemessen auf den <i>M. smegmatis</i> Stämmen SMR5 und DSM 43468	81
Tabelle 25: Sequenzidentitäten der Lysine B im direkten Vergleich	91

Tabelle A 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	126
Tabelle A 2: <i>Primer</i> -Sequenzen und Beschreibungen ausgewählter <i>Primer</i>	129
Tabelle A 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Lysine	130
Tabelle A 4: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der verwendeten AMPs	131
Tabelle A 5: Sequenzidentitäten der Lysine A im direkten Vergleich.....	135
Tabelle A 6: Standard-Aktivitätstest für die Optimierung der verwendeten Molarität für die KBE Reduktion auf <i>M. smegmatis</i> SMR5 und <i>M. fortuitum</i>	137
Tabelle A 7: Vergleich der MIC-Werte verschiedener Endolysine und Lysine A	138

Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren wurden gemäß der Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Schreibweise abgekürzt.

Die Nukleotide wurden entsprechend der Einbuchstaben-Schreibweise abgekürzt.

Å	Ångström (10^{-10} m)
$0,1\% A_x$	spezifischer Extinktionskoeffizient bei x nm
Abs	Absorption
Amp	Ampicillin
AMP	Antimikrobielles Peptid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaare
CBD	Zellwand-Bindedomäne
cm	Zentimeter ($1 \cdot 10^{-2}$ m)
<i>cord factor</i> , TDM	Trehalose-Dimycolat
Crx	<i>Crude extract</i> (lösliche Fraktion eines Zellextrakts)
d	Schichtdicke der Küvette [cm]
Da	Dalton [g/mol]
DL	Durchlauf des Chromatographie-Auftrags
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat (N= A, C, G oder T)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat der Affinitätschromatographie
EAD	enzymatisch aktive Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (Autoren) (<i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm, Zentrifugalbeschleunigung
GlcNac, NAG	N-Acetylglucosamin
gp	Genprodukt
h	Stunde(n)
-H oder H-	Hexahistidin- <i>Tag</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Puffer
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie bildende Einheit
<i>lacZ</i>	Gen für die β-Galactosidase
LB	Lysogeny-Broth (-Medium)
Log ₁₀	dekadischer Logarithmus zu der Basis 10
M	Molar [mol/l]
m	Milli ($1 \cdot 10^{-3}$)
mA	Milliampère

m-DAP, meso-DAP	meso-Diaminopimelinsäure
MIC	<i>minimal-inhibitory-concentration</i> ; minimale, (wachstums-) inhibitorische Konzentration
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure Puffer
MPa	Megapascal
MurNac, NAM	N-Acetylmuraminsäure
MurNGlyc, <i>glycolated</i> NAM	N-Glycolylmuraminsäure
MW	Molekulare Masse
n	nano ($1 \cdot 10^{-9}$)
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauchlorid
OD _x	optische Dichte bei x nm
P	Pellet (unlösliche Fraktion eines Zellextraktes)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>Phosphor-Buffered-Saline</i> Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMA	Propidium Monoazid
Red.	Reduktion
RT	Raumtemperatur
Upm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
s, sec	Sekunde(n)
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Temperatur
TB	Tuberkulose
T _M	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol Puffer
FTSA	<i>Fluorescence based Thermal Shift Assay</i>
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE	voll-entionisiert
wt	Wildtyp
(^m / _v)	Masse pro Volumen
(^v / _v)	Volumen pro Volumen
Ø	Durchmesser
Δ	Deletion
ε _x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
λ	Wellenlänge
θ _{MRW}	durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure
θ _{obs}	gemessene Elliptizität
μ	Mikro ($1 \cdot 10^{-6}$)

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten die Lysine A und B der vier Mykobakteriophagen Bxz2, D29, L5 und TM4 charakterisiert werden. Zudem sollten für ausgewählte Lysine Fusionen mit antimykobakteriellen Peptiden, sogenannte Artily sine erzeugt werden. Lysine und Artily sine sollten anschließend mit unterschiedlichen Methoden auf ihre antimykobakterielle Wirkung untersucht und geeignete Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung identifiziert werden.

Die Ergebnisse der rekombinanten Expression zeigten dabei, dass die Lysine trotz optimierter Puffer einen hohen Anteil in der unlöslichen Fraktion aufwiesen. So konnte nur für die Lysine A Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 und das Lysin B D29gp12 eine gute lösliche Expressionsausbeute erhalten werden. Außerdem wurde, vermutlich aufgrund der hohen Oberflächenhydrophobizität, eine starke Aggregationstendenz der Lysine beobachtet. Die Untersuchung des Oligomerisierungszustandes zeigte, dass die Lysine A Oligomere bildeten, wobei anhand der Ergebnisse der Lysin A Deletionsvarianten gefolgert wurde, dass die Zellwand-Bindedomäne diese intermolekulare Interaktion vermittelte. Die *in vitro* Aktivität der Lysine A und der Lysine B wurde charakterisiert. Aufgrund eines hohen *in vitro* Aktivitätsverlustes während der Lagerung bei 4 °C für mehrere Tage wurde für die Lysine B Bxz2gp12 und D29gp12 eine Optimierung des Lagerungspuffers durchgeführt und es konnte eine deutliche Verbesserung erreicht werden. Zudem wurde exemplarisch für D29gp12 eine thermische Stabilisierung mittels Mutagenese durchgeführt, wobei eine Erhöhung der Schmelztemperatur von + 9,6 °C auf 63,9 °C erreicht werden konnte. Für die in der Folge erzeugten Artily sine wurden generell geringere lösliche Expressionsausbeuten als für die entsprechenden Lysine erhalten, wobei diese Beobachtung auf eine Kombination verschiedener Faktoren, wie eine höhere Toxizität für die Expressionszellen oder eine stärkere Aggregationstendenz, zurückgeführt wurde. Allerdings war der Effekt bei den verwendeten Peptiden unterschiedlich, wobei LL-37 und SMAP-29 Fusionen nur minimale lösliche Expressionsausbeuten und PK oder pK34 Fusionen zwar verringerte, jedoch immer noch gute lösliche Expressionsausbeuten aufwiesen. Dieser Unterschied zeigte sich auch bei der *in vitro* Aktivität der Lysine B, wobei D29gp12 Fusionen mit LL-37 und SMAP-29 zu einer Reduktion des Substratumsatzes führten, während für die Fusionen mit PK und pK34 eine mit dem unmodifizierten Lysin vergleichbare *in vitro* Aktivität beobachtet wurde.

Die Untersuchungen der antimykobakteriellen Aktivität der Lysine und Artily sine ergab, dass die Lysine A bei der Anwendung von außen keine Wirkung auf die Mykobakterien zeigten. Die Mykomembran stellt somit eine Barriere für diese Proteine dar. Das Lysin B D29gp12 zeigte hingegen bereits im nanomolaren Bereich eine Wachstumsinhibition auf *M. smegmatis* und ergab eine signifikante Reduktion der Kolonien bildenden Einheiten von 7 log₁₀ auf *M. smegmatis* SMR5 und circa 3,6 log₁₀ auf *M. fortuitum*. Die weiteren Untersuchungen zeigten zudem, dass D29gp12 auch auf

den Vertreter der langsam wachsenden Mykobakterien *M. bovis* BCG eine antimykobakterielle Wirkung aufwies. Allerdings konnte keine Verbesserung dieser Aktivität durch die Kombination aus Lysin A und Lysin B beobachtet werden. Die Untersuchung der Artily sine A und Artily sine B ergab, dass die Fusion mit den AMPs zu keiner Verbesserung der Aktivität auf *M. smegmatis* und *M. fortuitum* führte, das Peptidoglykan dieser Spezies für die getesteten Artily sine A also nicht zugänglich war. Während für die Artily sine B auch auf *M. bovis* BCG keine Verbesserung der Aktivität beobachtet wurde, zeigten die Artily sine A TM4gp29-H-PK und TM4gp29-H-pK34 im Gegensatz zu dem unmodifizierten Lysin A eine Wachstumsinhibition und eine deutliche Reduktion der lebenden Zellen. Das Lysin A TM4gp29 konnte demnach durch die Fusion mit diesen Peptiden die Mykomembran von *M. bovis* BCG überwinden, was die Anwendbarkeit der Artily sin Technologie auf Mykobakterien belegte.

Die folgende Visualisierung des antimykobakteriellen Effektes mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie zeigte, dass die Aktivität von Lysin B D29gp12 nicht zu einer Lyse der Zellen, sondern zu einem Verlust von zytoplasmischem Material führte. Vermutlich erzeugte die Spaltung der kovalenten Verbindung zwischen den Mykolsäuren und dem Arabinogalaktan eine Destabilisierung der Mykomembran. Während die Behandlung mit Lysin A keinen Effekt auf die Zellen hatte, zeigte die Mischung von Lysin A und Lysin B nicht nur einen Verlust des zytoplasmischen Materials, sondern auch eine Fragmentierung der Zellen. Die Destabilisierung der Mykomembran machte somit das Peptidoglykan für das Lysin A zugänglich.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass das Lysin B D29gp12 auch ohne Fusion an ein AMP eine gute antimykobakterielle Aktivität aufweist und für eine Abtötung der untersuchten Mykobakterienstämme ausreichend ist. Der antimykobakterielle Effekt beruhte dabei nicht auf der Lyse der Zellen, sondern auf dem Verlust von zytoplasmischem Material. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Artily sin Konzept prinzipiell auf Mykobakterien anwendbar ist.

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Mycobacterium*

Mykobakterien (Lehmann K. B. and Neumann R. O., 1896) sind aerophile, Gram positive Zellen mit einer Stäbchen-Morphologie (Rastogi N. *et al.*, 2001; Dworkin M. and Falkow S., 2006). Sie zeichnen sich durch eine säurefeste Zellwand aus und sind entweder unbeweglich oder bewegen sich mit einem Gleitmechanismus fort (Henrichsen J., 1972; Martinez A. *et al.*, 1999). Die Gattung ist wiederum in zwei Gruppen, die schnell wachsenden Mykobakterien, wie z.B. *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*), und die langsam wachsenden Mykobakterien, wie z.B. *M. tuberculosis* und *M. leprae* unterteilt. Dabei werden die Gruppen durch die Verdopplungszeiten von unter fünf Stunden (schnell wachsend) bzw. 20 und mehr Stunden (langsam wachsend) unterschieden. Zudem werden die Arten auf Basis der ribosomalen-16S-RNA-Sequenzen den entsprechenden Gruppen zugeordnet (Rogall T. *et al.*, 1990; Stahl D. A. and Urbance J. W., 1990; Jagielski T. *et al.*, 2014).

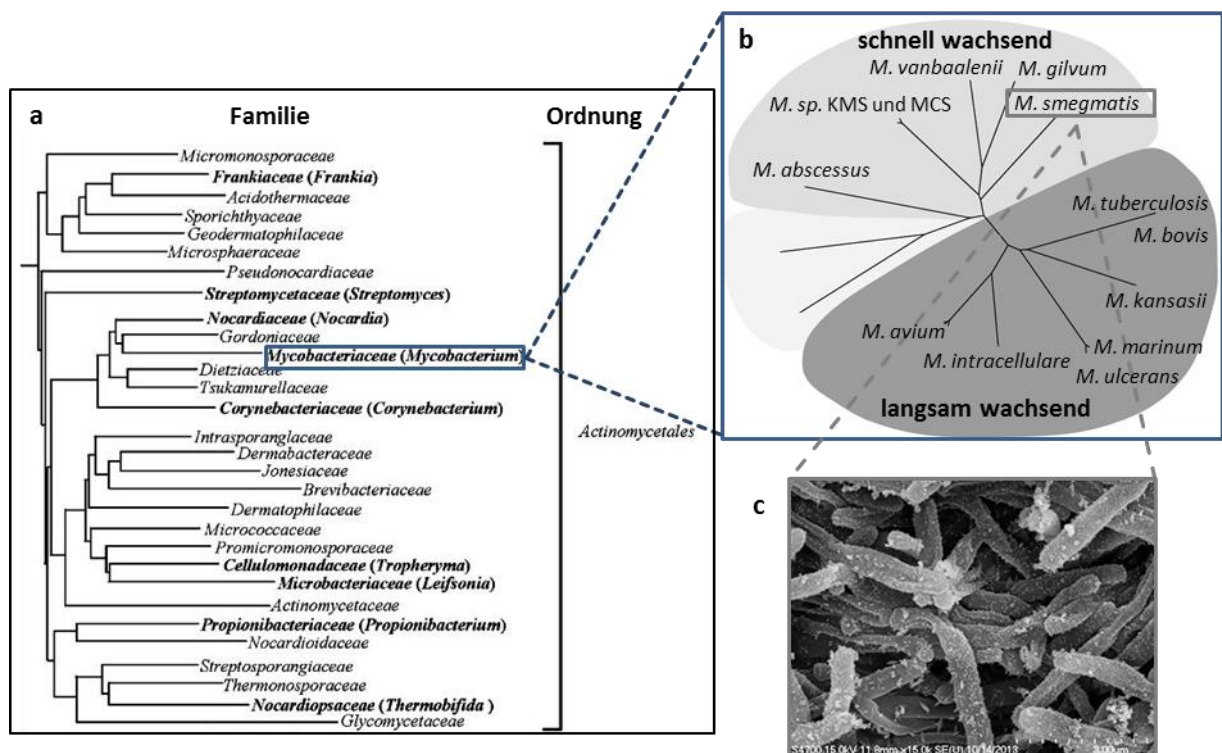


Abbildung 1: (a) Phylogenetischer Baum der Ordnung Actinomycetales basierend auf der 16S rRNA; modifiziert nach Ventura *et al.*, 2006; (b) Phylogenetischer Baum der verschiedenen Abstammungslinien der Gattung *Mycobacterium*; modifiziert nach Veyrier *et al.*, 2009; (c) Raster-Elektronen-Mikroskopische Aufnahme von *M. smegmatis*; modifiziert nach Lai M. J. *et al.*, 2015

Taxonomisch gehören die Mykobakterien zu der Ordnung der Actinomycetales und in dieser Ordnung zu der Gruppe der Mycolata, der z.B. auch die Gattungen *Corynebacterium* und *Nocardia* zugeordnet sind (Chun J. *et al.*, 1996). Diese Mycolata zeichnen sich dadurch aus, dass sie als einzige Bakterien die

Fähigkeit zu der Synthese von Mykolsäuren haben (Rastogi N. *et al.*, 2001), welche eine wichtige Komponente der außergewöhnlichen und komplexen Zellwand sind.

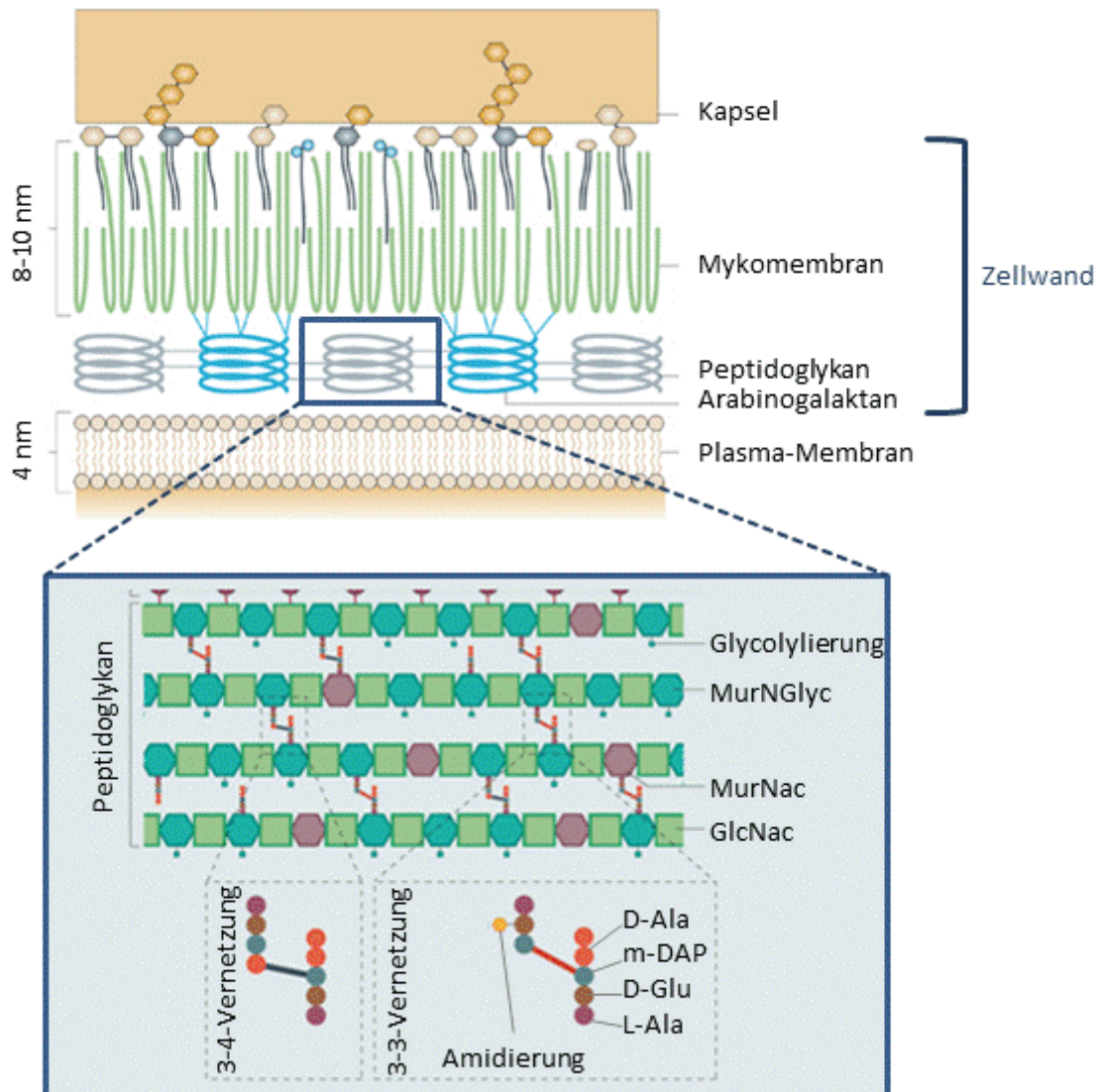


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellhülle von *M. tuberculosis*; modifiziert nach Abdallah A. M. *et al.*, 2007 (oben) und des Aufbaus des mykobakteriellen Peptidoglykans; modifiziert nach Kieser K. J. und Rubin E. J., 2014 (unten)

Die äußere Hülle besteht aus der inneren Zytoplasmamembran und der Zellwand. Diese besteht aus Peptidoglykanschicht, Arabinogalaktanschicht und Mykolsäureschicht. Dabei ist das Arabinogalaktan kovalent mit Peptidoglykan und Mykolsäuren verknüpft. Die Mykolsäuren bilden zudem mit den eingelagerten freien Lipiden die äußere Membran bzw. Mykomembran. An diese Mykomembran ist die Kapsel angelagert, die größtenteils aus Polysacchariden und Proteinen besteht.

Das Peptidoglykan besteht aus dem Zuckerrückgrad und den mit diesem verknüpften, zum Teil vernetzten Peptidstämmen. Das Zuckerrückgrad ist aus alternierenden Einheiten von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) verknüpft mit N-Glycolylmuraminsäure (MurNGlyc) bzw. N-Acetylmuraminsäure (MurNac) aufgebaut. Die Peptidstämme sind wiederum über die MurNGlyc bzw. MurNac Einheiten mit dem Zuckerrückgrad verbunden und bestehen aus L- bzw. D-Alanin (L- bzw. D- Ala), D-Glutaminsäure (D-Glu) und der meso-Diaminopimelinsäure (m-DAP). Zudem ist die Mehrheit der Peptidstämme über 3-4-Peptid-Vernetzungen (3-4-Vernetzung) oder 3-3-Peptid-Vernetzungen (3-3-Vernetzung) verbrückt.

Bei der Gattung *Mycobacterium* (Brennan P. J. and Nikaido H., 1995; Jankute M. *et al.*, 2015) weist das Peptidoglykan den Chemotyp A1_y auf (Schleifer K. H. and Kandler O., 1972), wobei das Polysaccharid-Rückgrat aber aus alternierenden Einheiten von β_{1-4} verknüpften N-Acetylglucosamin (GlcNAc bzw. NAG) mit N-Glycolylmuraminsäure (MurNGlyc bzw. *glycolated* NAM) oder

N-Acetylmuraminsäure (MurNac bzw. NAM) besteht (Brennan P. J. and Nikaido H., 1995; Mahapatra S. *et al.*, 2005a; Vollmer W., 2008). Zudem weist das Peptidoglykan einen im Vergleich zu *E. coli* (ebenfalls Peptidoglykan Chemotyp A1y, Schleifer K. H. and Kandler O., 1972) deutlich höheren Grad der Vernetzung der Peptidstämme auf. Außerdem enthält es neben den üblichen 4-3-Peptid-Vernetzungen, hauptsächlich 3-3-Peptid-Vernetzungen, die zwischen je einem Diaminopimelinsäure-Rests des Peptidstammes gebildet werden (Lavollay M. *et al.*, 2008; Kumar P. *et al.*, 2012). Auch meso-Diaminopimelinsäure (m-DAP bzw. meso-DAP) und D-Glutaminsäure (D-Glu) Untereinheiten des Peptidstammes können chemisch modifiziert sein, wobei die freie Carboxyl-Gruppe von meso-DAP amidiert, und die freie Carboxyl-Gruppe von D-Glu amidiert oder mit Glycin verknüpft vorliegen kann (Kotani S. *et al.*, 1970; Mahapatra S. *et al.*, 2005b).

Die kovalente Verbindung des Peptidoglykans an die Arabinogalaktan-Schicht erfolgt als Phosphodiester-Verknüpfung zwischen der C₆ Position der MurNGlyc mit der α -L-Rhamnopyranose-(1-3)- α -D-GlcNAc-1-Phosphat Region der Galaktankette (McNeil M. *et al.*, 1990). Galaktan ist ein Polymer aus D-Galaktose Untereinheiten und ist zusätzlich mit langen D-Arabinose-Polymeren verknüpft (Misaki A. *et al.*, 1974). Dieses Arabinan, das auch Modifikationen mit Succinyl oder Galactosamin aufweisen kann (Crick D. C. *et al.*, 2001) ist über Esterbindungen mit den Mykolsäuren und damit mit der Mykomembran verbunden (Jankute M. *et al.*, 2015).

Die Mykolsäuren werden durch die Claisen-Kondensation eines C₂₂-C₂₆ α -branch mit einem C₄₂-C₆₂ Meromycolat synthetisiert und durch eine Vielzahl von Enzymen weiter modifiziert. Dabei werden drei unterschiedliche Varianten, die α -, Methoxy- und Keto-Mykolsäure gebildet, die unterschiedliche Grade der Sättigung, der Cyclopropanierung und der Oxygenierung aufweisen (Yuan Y. *et al.*, 1995; Watanabe M. *et al.*, 2001; Takayama K. *et al.*, 2005; Marrakchi H. *et al.*, 2014; Jankute M. *et al.*, 2015). Diese hohen Kohlenstoffkettenlängen der Mykolsäuren zeichnen die Gattung *Mycobacterium* gegenüber den anderen *Mycolata* aus (Barry C. E., 3rd *et al.*, 1998) und haben in Verbindung mit den verschiedenen Modifikationen der Mykolsäuren einen entscheidenden Einfluss auf die Fluidität (Liu J. *et al.*, 1996) und damit auf die Barriere-Funktion der Mykomembran (Jarlier V. and Nikaido H., 1994). Die Mykomembran ist aus Mykolsäuren und verschiedenen freien Lipiden, wie z.B. phenolischen-Glycolipiden, Phthiocerol-Dimycocerosaten und Trehalose-Dimycolat (*cord factor*), zusammengesetzt (Hoffmann C. *et al.*, 2008; Zuber B. *et al.*, 2008; Daffé M. *et al.*, 2014; Jankute M. *et al.*, 2015) und enthält bei allen bisher untersuchten *Mycobacterium*-Arten eine an die äußere Schicht angelagerte Kapsel, die hauptsächlich aus Polysacchariden und Proteinen besteht (Sani M. *et al.*, 2010). Während die genaue Zusammensetzung dieser Kapsel zwischen den verschiedenen Arten variiert (Daffé M. *et al.*, 2014), stellt sie jedoch bei allen eine weitere Barriere dar.

Der hochkomplexe Aufbau der äußeren Strukturen der Mykobakterien ist verantwortlich für die Säurefestigkeit der Zellwand (Goren M. B. *et al.*, 1978) und die Resistenz der Mykobakterien gegen

verschiedene Umwelteinflüsse (Brennan P. J. and Nikaido H., 1995; Santos R. *et al.*, 2015), wie z.B. ein saures Milieu (Rao M. *et al.*, 2001). Auch die Bewegung mit dem Gleitmechanismus (Recht J. and Kolter R., 2001) wird stark durch die Zusammensetzung dieser äußeren Strukturen beeinflusst. Dabei zeigen die einzelnen Arten unterschiedlich stark ausgeprägte Charakteristika, die jeweils eine Anpassung an ihr bevorzugtes Habitat darstellen.

1.2. Relevanz der Gattung *Mycobacterium* für den Menschen

Einige Mykobakterienarten, wie *M. abscessus*, *M. leprae*, *M. bovis* und *M. tuberculosis*, sind hoch pathogen und sehr stark an die pathogene Lebensweise angepasst. So weist zum Beispiel *M. tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose (TB) und damit eines der bedeutendsten humanpathogenen Bakterien, Anpassungen seiner äußeren Strukturen auf, die die Interaktion des Immunsystems des Wirtes mit den pathogenen Mykobakterien beeinflussen (Flynn J. L. and Chan J., 2003) und zu der latenten Infektion des Wirtes beitragen (Dutta N. K. and Karakousis P. C., 2014).

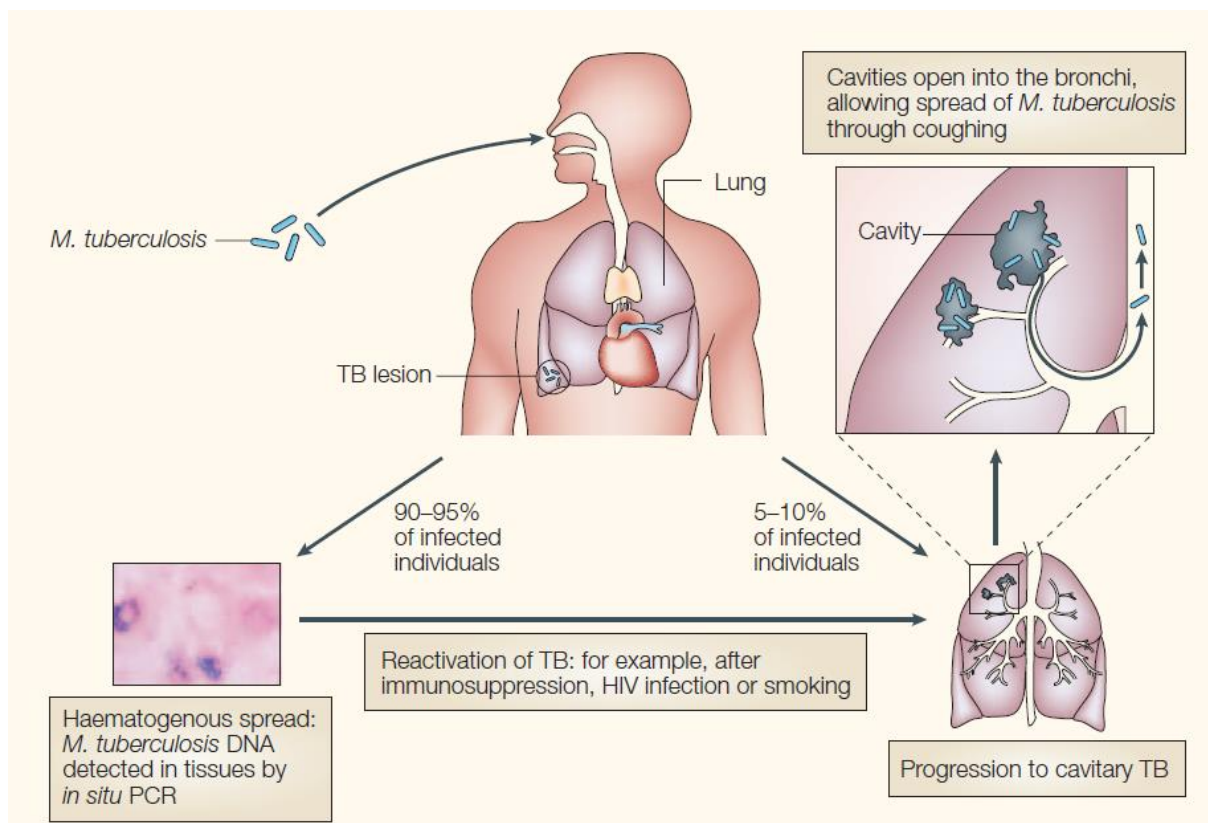


Abbildung 3: Stadien der Infektion mit *M. tuberculosis* (Rook G. A. *et al.*, 2005)

M. tuberculosis Zellen werden über die Atmung aufgenommen und gelangen über die Atemwege in die Lunge. In circa 30 % der Fälle kann das Immunsystem nicht alle Zellen eliminieren und es kommt zur Infektion. Dabei entsteht in circa 10 % der Fälle eine kavernöse Tuberkulose, bei der *M. tuberculosis* Zellen in Kavitäten der Lunge wachsen und über das Husten als infektiöses Aerosol in die Umgebung des infizierten Wirtes abgegeben werden. In circa 90 % der Fälle kommt es zu einer latenten Infektion des Wirtes, wobei diese durch verschiedene Faktoren wie z.B. eine Immunsuppression reaktiviert werden kann (Dutta N. K. and Karakousis P. C., 2014).

Bei dieser latenten Infektion, die bei circa 90 % der Infektionen stattfindet, leben die *M. tuberculosis* Zellen hauptsächlich im Inneren von Makrophagen, von Lymphknoten und in Granulomas. Dort vermehren sie sich auch, wobei sie einen deutlich reduzierten Stoffwechsel und eine stark reduzierte Zellteilungsrate aufweisen (Dutta N. K. and Karakousis P. C., 2014). Zudem gelangen die Mykobakterien durch ihre intrazelluläre Lebensweise in den Makrophagen in alle Gewebe des Körpers und können auch die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Dies erschwert die Behandlung, da Wirkstoffe in ausreichenden Konzentrationen in das Innere der Makrophagen und dort in die *M. tuberculosis* enthaltenden Phagosomen gelangen müssen, um alle mykobakteriellen Zellen zu erreichen.

Die World Health Organisation (WHO) schätzte 2015, dass circa 2-3 Milliarden Menschen latent mit *M. tuberculosis* infiziert sind. Allein im Jahr 2014 wurden circa 9,6 Millionen neue Tuberkulosefälle und circa 1,5 Millionen Todesfälle durch TB von der WHO dokumentiert (World Health Organization, 2015). Während ein Großteil dieser Tuberkulosefälle mit den verfügbaren Antibiotika behandelbar war, wurde dennoch in circa 3,3 % der neuen Fälle und in circa 20 % der zuvor behandelten Fälle eine *Multi-Drug-Resistance* (MDR), die als Resistenz gegen Isoniazid und Rifampicin definiert ist, ermittelt. Zudem waren circa 9,7 % dieser Fälle *Extensively-Drug-Resistant* (XDR), was als MDR mit zusätzlicher Resistenz gegen mindestens ein Fluoroquinolon und ein injizierbares ‚*second-line*‘ Antibiotikum definiert ist (World Health Organization, 2015). Gerade die Resistenzbildung gegen die ohnehin nur geringe Zahl der zur Verfügung stehenden Antibiotika stellt ein enormes Problem dar (World Health Organization, 2014), da es keinen für Erwachsene wirksamen Impfstoff gegen *M. tuberculosis* gibt. Deswegen werden neue Wirkstoffe dringend benötigt (Dheda K. *et al.*, 2014), wobei bereits eine Verringerung der nötigen Behandlungsdauer, die mit den aktuell verwendeten Medikamenten bei mindestens sechs Monaten liegt (Dartois V., 2014; Horsburgh C. R. *et al.*, 2015), eine große Verbesserung der Situation bedeuten würde. Auch in der Diagnostik könnten neue Wirkstoffe zu deutlichen Verbesserungen führen. So empfiehlt das Robert-Koch-Institut bei der Diagnostik der Tuberkulose, dass zusätzlich zu den mikroskopischen und den PCR-basierten Techniken immer ein kultureller Nachweis durchgeführt werden sollte, um eine korrekte Diagnose treffen zu können. Die kulturellen Techniken weisen aber, aufgrund der langsamen Teilungsrate von *M. tuberculosis* (16 - 20 h), mit circa sechs Wochen eine hohe Nachweiszeit auf. Daher könnte man durch die Verbesserung der PCR-basierten Diagnosemethoden eine deutliche Reduktion dieser benötigten Nachweiszeiten erreichen (Radomski N. *et al.*, 2013; Robert-Koch-Institut, 2013; Hanson C. *et al.*, 2014; Engstrom A., 2015; Pai M., 2015; Pai M. and Schito M., 2015).

Neben der medizinischen Bedeutung sind mykobakterielle Infektionen auch von hoher wirtschaftlicher Relevanz. So wurden für die EU alleine 2011 entstandene Kosten von 537 Millionen Euro durch humane Tuberkulose ermittelt (Diel R. *et al.*, 2014). Zudem erzeugen

mykobakterielle Infektionen von Nutztvieh enorme wirtschaftliche Schäden. So entstanden z.B. durch *M. bovis*, der Erreger der Tuberkulose in Rindern (Smith R. L. *et al.*, 2014) und anderen Säugern, im Finanzjahr 2012/2013 allein in Großbritannien Kompensations- und Schlachtungskosten von circa 46 Millionen Pfund (circa 63 Millionen Euro).

1.3. Mykobakteriophagen

Auf der Suche nach neuen Wirkstoffen werden auch Bakterien infizierende Viren, sog. Bakteriophagen oder Phagen (d'Herelle F., 1917) intensiv erforscht. Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die virulenten Phagen, die nur einen lytischen Vermehrungszyklus aufweisen und die temperenten Phagen, die auch einen lysogenen Zyklus aufweisen. Gemeinsam ist beiden Gruppen dabei die Adsorption des Phagen an die Wirtszelle (Adsorption) und die Injektion des Phagenerbgutes in das Zytoplasma des Bakteriums (Injektion). Im lytischen Zyklus wird der Stoffwechsel der Wirtszelle dann auf die Produktion der Komponenten von neuen Phagenpartikeln umgestellt (Subversion) und es werden neue Phagen produziert (Synthese und Zusammensetzen). Am Ende des Zyklus wird die Zelle durch Peptidoglykan abbauende, phagencodierte Enzyme, die Endolysine lysiert und die Phagen werden freigesetzt (Freisetzung). Bei dem lysogenen Zyklus hingegen wird das Phagenerbgut in das Genom des Wirtes stabil integriert (Integration) und bei der Vermehrung des Bakteriums an die Tochterzellen weitergegeben. Hier kann dieses integrierte Erbgut jedoch induziert werden (Induktion), was einen lytischen Zyklus auslöst (Madigan M. T. and Brock T. D., 2013).

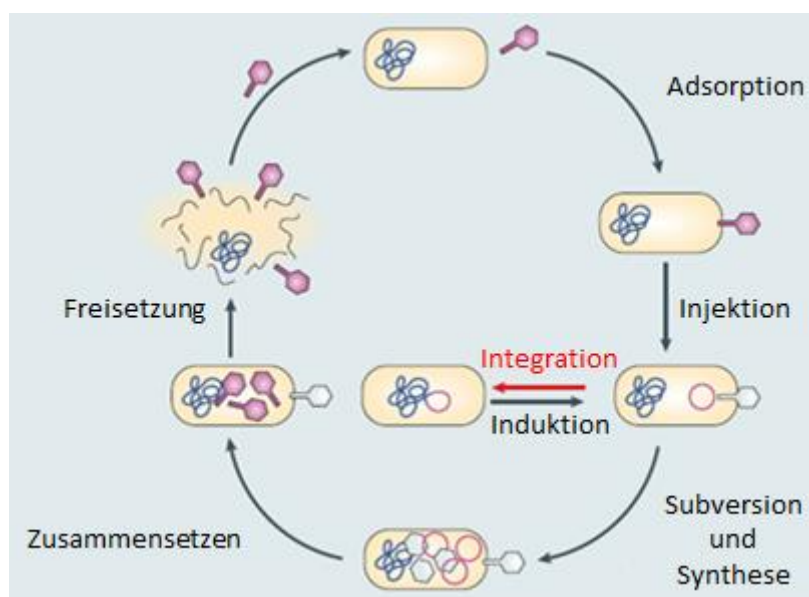


Abbildung 4: Darstellung des lytischen und des lysogenen Replikationszyklus von Bakteriophagen; modifiziert nach Sturino J. M. und Klaenhammer T. R., 2006

Zusätzlich zu der Unterscheidung in lytische und lysogene werden Phagen anhand ihrer Morphologie und der enthaltenen Nukleinsäure in verschiedene Ordnungen unterteilt. 95 % aller Phagen gehören dabei zu den *Caudovirales*, die eine dsDNA besitzen und ein ikosaedrisches Kapsid mit einem Schwanzstück aufweisen. Innerhalb der *Caudovirales* sind die Phagen zudem in Familien gruppiert, die *Siphoviridae*, die *Myoviridae* und die *Podoviridae*, die nach Schwanzkontraktilität und -morphologie unterschieden werden (International Committee on Taxonomy of Viruses and King A. M. Q., 2012).

Für die Anwendung von Phagen als Wirkstoffe sind vor allem lytische Phagen der verschiedenen Ordnungen von besonderem Interesse. Die sogenannte Phagentherapie (Alisky J. *et al.*, 1998; Skurnik M. and Strauch E., 2006; Keen E. C., 2012) hat bei entsprechender Auswahl der Phagen unter anderem den Vorteil, dass eine selektive Abtötung des Wirtes ermöglicht wird. Der Ansatz weist jedoch trotz großer Fortschritte weiterhin verschiedene Probleme und Limitierungen auf (Nobrega F. L. *et al.*, 2015), wie z.B. die Resistenzbildung der Bakterien gegen die verwendeten Phagen (Labrie S. J. *et al.*, 2010) oder die Immunogenität der Phagen im Menschen (Keen E. C., 2012). Auch die Mykobakterien infizierenden Mykobakteriophagen sind deswegen bei der Suche nach neuen Wirkstoffen von großem Interesse. Morphologisch gehören die meisten der bisher beschriebenen Mykobakteriophagen zu den *Caudovirales*, und innerhalb der Ordnung zu den *Siphoviridae* und *Myoviridae* (Hatfull G. F., 2014b).

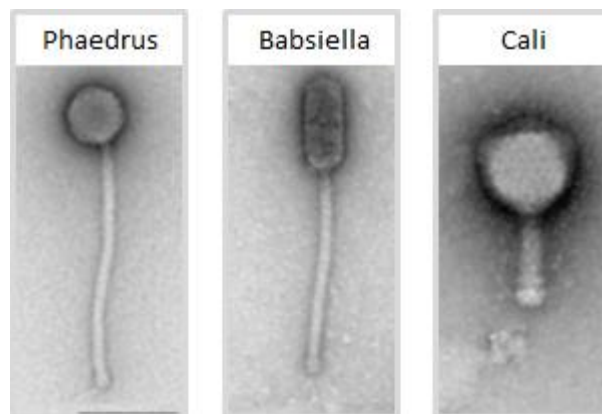


Abbildung 5: Beispiele der Morphologie von Mykobakteriophagen; modifiziert nach Hatfull G. F., 2014

Die Phagen Phaedruss und Babsiella zeigen eine *Siphoviridae*-Morphologie und der Phage Cali wurde den *Myoviridae* zugeordnet

Bisher wurden mehrere Tausend Mykobakteriophagen isoliert, zumeist auf dem *M. smegmatis* Stamm mc²155, und die Genome von über 500 dieser Phagen sequenziert. Basierend auf bioinformatischen Analysen konnten unterschiedliche Gruppen, sogenannte *Cluster*, identifiziert werden. Dabei werden die Phagen einem *Cluster* zugeordnet, deren Genom mindestens 50 % Sequenzähnlichkeit zu einem anderen Mitglied dieses *Clusters* aufweist. Da die Mykobakteriophagen einiger *Cluster* eine weitere Heterogenität bezüglich des Grades der Sequenzähnlichkeit zeigten, wurden diese in *Subcluster* unterteilt (Hatfull G. F., 2014a; Pope W. H. *et al.*, 2015). Allerdings wurde

diese Einteilung nicht nur bei Sequenzvergleichen erhalten, sondern wurde auch als eine starke Korrelation zwischen dem *Cluster* bzw. *Subcluster* und der Fähigkeit *M. tuberculosis* zu infizieren gefunden (David H. L. *et al.*, 1980; Jacobs-Sera D. *et al.*, 2012; Hatfull G. F., 2014a). Bei der näheren Analyse des Wirtsspektrums von 14 Vertretern verschiedener *Cluster* wurde unter anderem für die Phagen Bxz2, D29 und L5 ein breites Wirtsspektrum beobachtet. Auch der Phage TM4 konnte neben *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* weitere Arten, nämlich die getesteten *M. bovis* und *M. ulcerans* Stämme infizieren und zeigte damit ein intermediäres Wirtsspektrum (Rybniker J. *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurden diese vier Mykobakteriophagen als gut geeignete Kandidaten für die Suche nach neuen Wirkstoffen ausgewählt, da sie sowohl das häufig verwendete Surrogat *M. smegmatis* (Shiloh M. U. and Champion P. A., 2010), als auch die potentiellen Zielkeime *M. tuberculosis* und *M. bovis* effizient infizieren können. Xiong *et al.* konnten beispielsweise für den Phagen D29 zeigen, dass er von mit *M. tuberculosis* infizierten Makrophagen aufgenommen wird und die intrazellulären Mykobakterien infizieren kann. Zudem wurden keine signifikanten Veränderungen des Interleukin-12- und Stickstoffmonoxid-Levels beobachtet, woraus geschlossen wurde, dass dieser Phage keinen Effekt auf die Immunfunktion der Makrophagen ausübt. Die benötigten Phagentiter waren mit bis zu 10^9 *Plaque forming units* jedoch hoch und mussten mehrfach verabreicht werden, um diesen Effekt zu erhalten (Xiong X. *et al.*, 2014). In einer weiteren Studie wurde für D29 beobachtet, dass der Phage zwar an Mykobakterien bindet die unter Sauerstofflimitierung wachsen, den lytischen Zyklus jedoch nicht beenden kann. Daraus kann gefolgert werden, dass die Wachstumsbedingungen des Wirtes, durch die Veränderungen des Stoffwechsels etc., einen Einfluss auf die Replikation der Phagen haben können (Swift B. M. *et al.*, 2014). Diese Limitierungen erschweren generell die Anwendung der Phagen und deswegen wird auch der Ansatz verfolgt, nicht die Phagen, sondern ihre lytischen Enzyme als Wirkstoff zu verwenden (Fischetti V. A., 2008; Nelson D. C. *et al.*, 2012).

1.4. Die Enzyme Lysin A und Lysin B der lytischen Kassette von Mykobakteriophagen

Endolysine kommen in allen bekannten Phagen vor und erfüllen die Aufgabe, das Peptidoglykan am Ende des lytischen Replikationszyklus enzymatisch abzubauen, um die Freisetzung der gebildeten Phagenpartikel zu ermöglichen (siehe 1.2.). Dabei liegt das Gen für das Endolysin in der Regel in der lytischen Kassette des Genoms, die in vielen Fällen weitere Proteine, wie Holine oder Chaperone, die dem Endolysin die Überwindung der Zytoplasmamembran ermöglichen, enthält (Catalao M. J. *et al.*, 2013).

Endolysine sind Peptidoglykanhydrolasen, die nach der Bindung die sie spalten eingeteilt werden. N-Acetylmuramidasen und Endo- β -N-Acetylglukosaminidasen spalten die Verbindungen zwischen

den Untereinheiten des Zuckerrückgrads, lytische Transglycosylasen spalten die Verbindung zwischen den Peptidstämmen und dem Zuckerrückgrad und Endopeptidasen spalten Bindungen der Peptidstämme bzw. der Quervernetzungen. Die Endolysine der Phagen mit einem Gram negativen Wirt bestehen oft nur aus einer Domäne, die sowohl die Aktivität als auch die Bindung an das Substrat vermittelt. Endolysine von Phagen von Gram positiven Bakterien hingegen weisen typischerweise einen modularen Aufbau aus mehreren Domänen auf, wobei eine oder mehrere enzymatisch aktive Domänen (EAD) mit einer oder mehreren Zellwand-Bindedomänen (CBD) verknüpft sind. Aufgrund dieses Aufbaus können daher verschiedene funktionale Domänen in einem Endolysin vorliegen (Loessner M. J., 2005).

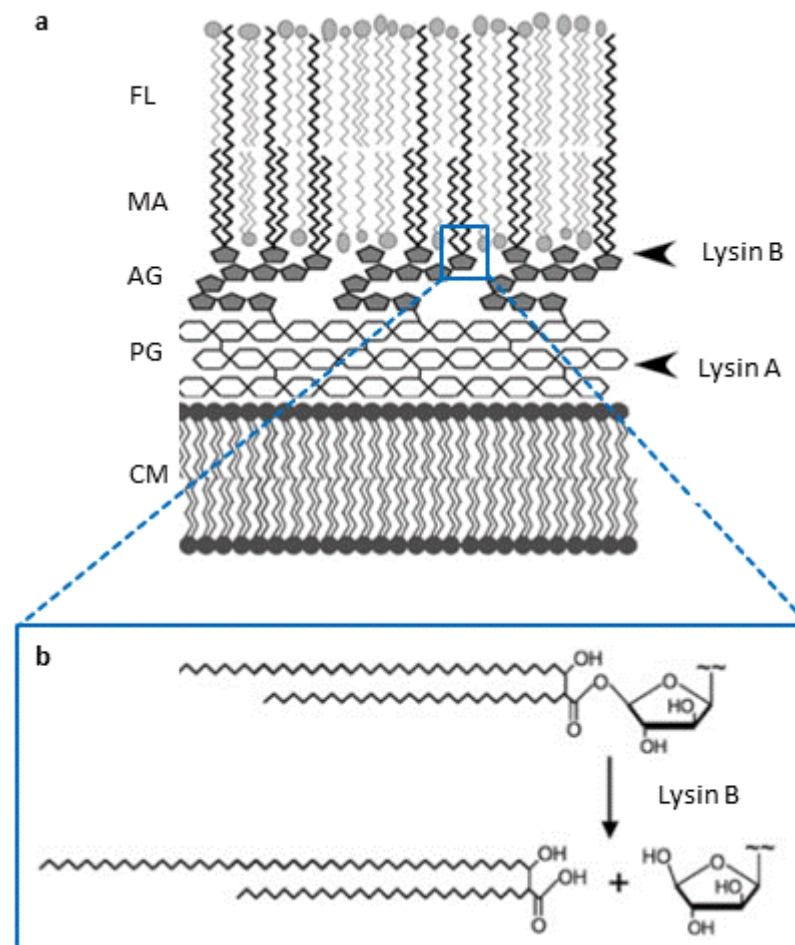


Abbildung 6: Angriffspunkte von Lysin A und Lysin B der lytischen Kassette der Mykobakteriophagen; modifiziert nach Payne K. *et al.*, 2009

(a) Die Pfeile zeigen die Angriffspunkte von Lysin A und Lysin B. CM stellt die Zytoplasmamembran, PG das Peptidoglykan, AG die Arabingalaktansicht, MA die Mykolsäuren und FL die freien Lipide dar. In (b) ist der Angriffspunkt des Lysin B, der Esterase, exemplarisch an einer Verknüpfung zwischen Arabinan und einer Mykolsäure gezeigt.

Neben dem Endolysin, dem sogenannten Lysin A, enthält die lytische Kassette der meisten Mykobakteriophagen ein zweites Enzym, das sogenannte Lysin B (Payne K. *et al.*, 2009). Die bisher beschriebenen Lysine A haben dabei einen modularen Aufbau und bestehen in der Regel aus einer C-terminalen CBD und einer oder zwei N-terminalen EADs. Zudem enthalten die Lysine A als EADs zu

circa 40 % eine N-Acetylmuramidase-, zu über 40 % eine lytische Transglycosylase- und in fast allen Fällen eine Endopeptidase-Domäne (Payne K. M. and Hatfull G. F., 2012). Für das zweite von der lytischen Kasette codierte Enzym, das Lysin B, wurde gezeigt, dass es die Esterbindung zwischen den Mykolsäuren und dem Arabinogalaktan spaltet und damit eine Mycolylarabinogalaktan-Esterase ist (Garcia M. *et al.*, 2002; Payne K. *et al.*, 2009; Gil F. *et al.*, 2010). Payne *et al.* konnten zudem belegen, dass das Lysin B für den Mykobakteriophagen Giles zwar nicht essentiell ist, aber einen Einfluss auf die Effizienz der Lyse hat, was an der Verringerung der *Plaque*-Größe und der bis zu hundertfachen Reduktion der Phagenpartikel pro *Plaque* in der Lysin B Deletionsvariante erkennbar war (Payne K. *et al.*, 2009). Über den Aufbau der Lysine B ist allerdings nur wenig bekannt. So wurde bisher nur die Kristallstruktur des Lysins B D29gp12 publiziert [PDB Eintrag: 3HC7], welches zu der Familie der α/β -Hydrolasen gehört und bis auf eine ungewöhnliche Domäne aus vier Helizes eine Cutinase-ähnliche Proteinstruktur aufweist (Payne K. *et al.*, 2009). Daher ist dieses Enzym eher den globulären Proteinen zuzuordnen, da keine klar getrennten Domänen beobachtet wurden.

1.5. Phagen Lysine als antibakterielle Wirkstoffe

Auch bei der Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen sind Endolysine sehr interessant, da ihre zellwandhydrolysierende Aktivität unabhängig von dem bakteriellen Stoffwechsel ist. Werden die Endolysine von außen zu Gram positiven Bakterienzellen zugegeben, töten sie diese durch den Abbau der Zellwand und der folgenden osmotischen Lyse (Fischetti V. A., 2008). Während dieser Ansatz erfolgreich auf viele Gram positive Bakterien angewendet werden konnte, war er jedoch für Gram negative Organismen nicht geeignet. Dabei konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass die äußere Membran eine Barriere für die Endolysine ist und dadurch die Aktivität auf die Bakterien verhindert (Nelson D. C. *et al.*, 2012). Auch die Mykomembran stellt eine solche Barriere dar. Um den Endolysinen zu ermöglichen, diese Barriere zu überwinden wurden verschiedene Ansätze verfolgt und Briers *et al.* konnten zeigen, dass die Fusionsproteine aus Endolysinen und polykationischen Peptiden die äußere Membran von *P. aeruginosa* effizient überwinden können. Diese Fusionsproteine wurden als Artily sine bezeichnet (Briers Y. *et al.*, 2014b). Das Artily sin Art-175 zeigte mit einer Lyse der Bakterien innerhalb von unter fünf Minuten zudem eine sehr schnelle Aktivität gegen *Pseudomonas* (Briers Y. *et al.*, 2014a). Dieses Konzept konnte erfolgreich für die Entwicklung von Artily sinen gegen verschiedenste Gram negative Organismen, wie z.B. *Acinetobacter baumannii*, angewendet werden. Zudem zeigten weitere Untersuchungen, dass die getesteten Artily sine im Gegensatz zu antimikrobiellen Peptiden, keine Zellzytotoxizität auf eukaryotische Zellen aufweisen. Neben der Entwicklung von Artily sinen gegen verschiedene Gram negative Erreger wurde auch der Effekt auf Gram positive Bakterien untersucht (Rodriguez N.

et al., 2016, eingereicht). Es konnte dabei gezeigt werden, dass entsprechende Artily sine auch gegen Gram positive Organismen eine höhere antimikrobielle Aktivität als das Endolysin aufweisen, was durch eine Verbesserung der Wirkung durch das für die Fusion verwendete antimikrobielle Peptid begründet wird (Rodriguez N. *et al.*, 2016, eingereicht).

1.6. Zielsetzung der Doktorarbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen geeignete Lysin A und Lysin B Kandidaten identifiziert, rekombinant produziert und charakterisiert werden, um dann in der Folge daraus Artily sine zu entwickeln und die mögliche Anwendung dieser Proteine als antimykobakterielle Wirkstoffe oder im Bereich der Diagnostik zu untersuchen.

Dafür werden zunächst Lysin A und Lysin B aus der lytischen Kassette von geeigneten Mykobakteriophagen ausgewählt, rekombinant in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Zudem sollen die benötigten *in vitro* Aktivitätstests für die Charakterisierung der Aktivität etabliert und optimiert werden, wobei für die Lysine A der Abbau von Peptidoglykan und für die Lysine B die Esterase-Aktivität gezeigt werden soll. Für die weiteren Experimente sollen dann anhand der Ausbeute, der Charakterisierung und der *in vitro* Aktivität geeignete Lysin A und B Kandidaten ausgewählt werden. Diese Kandidaten werden dann für die Konstruktion von Artily sinen zur Fusion mit antimikrobiellen Peptiden, die über eine Aktivität auf Mykobakterien verfügen, verwendet. Für die Testung der antimykobakteriellen Wirkung der Lysin Kandidaten und der Artily sine sollen außerdem Methoden für den Nachweis der Wachstumshemmung und der Zellabtötung etabliert werden. Dabei soll auch geprüft werden, ob Lysin A und Lysin B einen Synergismus ihrer Aktivitäten zeigen und welchen Effekt die Fusion mit den AMPs auf die Aktivität hat. Zudem soll der antimykobakterielle Effekt der Proteine auf die mykobakteriellen Zellen mit mikroskopischen Methoden untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Software

Autoklav Systec VX-150	Systec GmbH (Linden)
<hr/>	
Chromatographie-Anlage	
ÄKTA Explorer	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Unicorn Version 5.11 Build 407	
ÄKTA Prime plus	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Prime View Version 5.31 Build 743	
<hr/>	
Chromatographie-Säulen	
Affinitätschromatographiesäulen	
HiTrap IMAC Sepharose FF (5ml)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
HisTrap excel (1ml)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
Gelfiltrationschromatographiesäule	
Superdex 200 10/300 GL (analytisch)	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)
<hr/>	
Circular Dichroismus Spektropolarimeter J-815	Jasco Germany GmbH
Spectra Manager Version 2.09.01	(Gross-Umstadt)
<hr/>	
Dokumentation der Agarosegele	
MicroDoc	Cleaver Scientific Ltd (Rugby, UK)
ClearView UV-Schirm	Cleaver Scientific Ltd (Rugby, UK)
<hr/>	
ELISA Reader Tecan infinite M200Pro	Tecan Group Ltd. (Männedorf,
Magellan 7 (i-control Version 1.7)	Schweiz)
<hr/>	
Gelelektrophoresekammern	
Agarose-Elektrophorese-Kammern	
PerfectBlue Gelsystem Mini M	peqlab [VWR International GmbH
PerfectBlue Gelsystem Mini S	(Erlangen)]
PerfectBlue Gelsystem Mini S	peqlab [VWR International GmbH
PerfectBlue Gelsystem Mini S	(Erlangen)]
SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese-Kammer	
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules,
	USA)

Handkolonienzähler Wagner&Munz HC weiss Cord No. 608703	Wagner & Munz GmbH (München)
Handzähler Wagner&Munz Typ HS6594	Wagner & Munz GmbH (München)
Inkubatoren	
B115	BINDER GmbH (Tuttlingen)
BD115	BINDER GmbH (Tuttlingen)
BD53	BINDER GmbH (Tuttlingen)
B5060E	Hereaus [Thermo Fisher Scientific Germany BV&Co KG (Braunschweig)]
Thermostatschrank Aqualytic	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß)
Trockenschrank FED 115	BINDER GmbH (Tuttlingen)
Wärmeschrank UFE 500	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach)
Luminometer Victor ³ Multilabel Counter	PerkinElmer Inc.
Rührer	
Magnetrührer	
10043817	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)
7.487.057	VWR International GmbH (Erlangen)
MR-Hei-Mix S	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach)
Variomag Mono	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG (Braunschweig)
Heizrührer	
RCT basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)
RHbasic 2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG (Staufen)

Mikroskope

BZ 9000-Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence Deutschland GmbH (Neu-
Filter: TRITC HC Bright Line Basic	Isenburg)
Filterset (Propidiumiodid)	
Filter: OP-79301 SB Filter GFP-BP	
(SYTO 9)"	
CX41	Olympus Europa SE & Co. KG
	(Hamburg)

PCR-Gerät Peqstar 2x gradient	peqlab [VWR International GmbH
Firmware Version 4.0.80	(Erlangen)]

qPCR-Geräte

Mx3005P qPCR System	Agilent Technologies Inc. (Santa
Mx Pro QPCR software	Clara, USA)
7900HT Taqman Real-Time PCR System	Applied Biosystems [Thermo Fisher
SDS Version 2.4	Scientific Inc., USA]

pH-Meter inoLab® pH 7110	WTW Wissenschaftlich-Technische
	Werkstätten GmbH (Weilheim)

Photometer

V-650	Jasco Germany GmbH
Spectra Manager Version 2.09.40	(Gross-Umstadt)
WPA Biowave CO8000	Biochrom Ltd. (Cambridge, UK)

Plotting Apparatur Perfect Blue Semi-Dry	peqlab [VWR International GmbH
Elektroplotter SEDEC S	(Erlangen)]

Quarzküvetten

Makro-Küvette 110-QS mit Stopfen,	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim)
1mm Schichtdicke	
Type 31B Twin port, Micro Cells with	Starna Scientific Limited (Hainault,
Short Pathlength, 0.2mm, Far UV Quartz	UK)

Schüttelinkubatoren

Multitron Standard	Infors AG (Bottmingen/Basel, Schweiz)
Innova 40	New Brunswick Scientific Co. [Eppendorf AG (Hamburg)]
Certomat IS	Sartorius AG (Göttingen)
Certomat BS-1	Sartorius AG (Göttingen)
Tischschüttler RO 10	C. Gerhardt GmbH & Co. KG (Königswinter)

Spannungsquellen

High Voltage Power Pack P30	Biometra GmbH (Göttingen)
EV 231	peqlab [VWR International GmbH (Erlangen)]

Sterilbank MSC-Advantage

Thermo Fisher Scientific Germany
BV & Co KG (Braunschweig)

Thermomixer

Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Thriller	peqlab [VWR International GmbH (Erlangen)]

Ultraschall Sonoplus HD3200

Boosterhorn SH123G/Titanteller TT13	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin)
-------------------------------------	---

Vortexer

Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach)
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc. (New York, USA)

Waagen

EG 220-3NM	KERN & SOHN GmbH (Balingen-Frommern)
1205MP	Sartorius AG (Göttingen)

Wasseraufbereitung arium proVF

Sartorius AG (Göttingen)

Zählkammer Thoma CE 0,02mm Tiefe 0,0025mm²

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG
(Lauda-Königshofen)

Zell-Wachstums-Nachweis-System für Mykobakterien BD BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacteria Culture System	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
Zentrifugen	
Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Rotor: 4784-A	(Tuttlingen)
Sorvall RC 6+	Thermo Fisher Scientific Germany
Rotor: F10S-4x1000 LEX	BV & Co KG (Braunschweig)
Rotor: F13-14x50cy	
Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Rotor: 2424-B	(Tuttlingen)
Software/Webtools:	
CLC Main Workbench Version 6 und 7	CLCbio [QIAGEN GmbH – Germany (Hilden)]
EndNote X7.4 Build 8188	Thomson Reuters (New York, USA)
GNU image manipulation program 2.8.14	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam
NEBASECHANGER™ Version 1.2.3	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Paint.NET v3.5.11	dotPDN LLC
Protparam (Gasteiger E. <i>et al.</i> , 2003)	SIB Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, Schweiz)
CCP4MG (Mcnicholas S. <i>et al.</i> , 2011) Version 2.10.4	

2.1.2. Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Die Verbrauchsmaterialien und Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen.

4titude Limited	(Surrey, UK)
AMRESO LLC	(Solon, USA)
antibodies-online GmbH	(Aachen)
AppliChem GmbH	(Darmstadt)
Becton, Dickinson and Company	(Franklin Lakes, USA)
Bio-Rad Laboratories Inc.	(Hercules, USA)
Carl Roth GmbH + Co. KG	(Karlsruhe)
Corning Inc.	(New York, USA)
GE Healthcare Life Sciences	(Freiburg)
Greiner Bio-One International GmbH	(Kremsmünster, Österreich)
Hellma GmbH & Co. KG	(Müllheim)
Merck KGaA	(Darmstadt)
New England Biolabs GmbH	(Frankfurt am Main)
neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	(Heidelberg)
Novagen	[Merck KGaA (Darmstadt)]
Otto Nordwald GmbH	(Hamburg)
peqlab	[VWR International GmbH (Erlangen)]
Sarstedt AG & Co.	(Nümbrecht)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	(München)
VWR International GmbH	(Erlangen)
WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH	(Weilheim)

Eine Tabelle mit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien ist unter Anhang 1 wiedergeben.

2.1.3. Enzyme

DNA Polymerasen

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
Taq DNA Polymerase	peqlab [VWR International GmbH (Erlangen)]
Terra™ PCR Direct Polymerase Mix	Takara Bio Inc. (Kusatsu, Japan)
DNase I	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Lipase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> , powder, slightly beige, =160 U/mg	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Lysozyme, chicken egg white	Fluka [Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)]
Recombinant Enterokinase	Merck KGaA (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

2.1.4. Kits

BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	Promega Corporation (Madison, USA)
BLU-V Viability PMA Kit	QIAGEN GmbH - Germany (Hilden)
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, for microscopy & quantitative assays	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG (Braunschweig)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I S-Line	peqlab [VWR International GmbH (Erlangen)]
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH - Germany (Hilden)
QiaAMP Mini-Kit	QIAGEN GmbH - Germany (Hilden)
Slice pH	Hampton Research Corp. (Aliso Viejo, USA)
Solubility & Stability Screen	Hampton Research Corp. (Aliso Viejo, USA)

Terra™ qPCR Direct SYBR® Premix

Takara Bio Inc. (Kusatsu, Japan)

2.1.5. Vektoren

Für die Expression der Rekombinanten Proteine in *E. coli* wurden pET-Vektoren (plasmid for expression by T7 RNA Polymerase) (Studier F. W. and Moffatt B. A., 1986; Rosenberg A. H. *et al.*, 1987; Studier F. W. *et al.*, 1990) von Novagen [Merck KGaA (Darmstadt)] verwendet, die im Folgenden tabellarisch dargestellt sind:

Vektor	Antibiotika-Resistenz	Modifikationen	Verwendete Schnittstellen
pET-21b(+)	Ampicillin	-	NdeI XhoI
pET-21b noHis	Ampicillin	Insertion zweier STOP Codons nach der XhoI Schnittstelle	NdeI XhoI
pET-21b Nt-His	Ampicillin	Deletion des C-terminalen His-Tag® Insertion eines Methionins und einem folgenden N-terminalen His-Tag® vor der NdeI Schnittstelle	NdeI XhoI
pET-32b(+)	Ampicillin	-	NcoI XhoI
pET-32b noHis	Ampicillin	Insertion zweier STOP Codons nach der XhoI Schnittstelle	NcoI XhoI
pET-41a(+)	Kanamycin	-	NdeI XhoI

Tabelle 1: Verwendete Vektoren

2.1.6. Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) bezogen.

Ausgewählte Primer sind unter Anhang 2 tabellarisch dargestellt.

2.1.7. Längen- und Molekulargewicht- Standards

DNA-Längenstandard

DNA Sizer III

peqlab [VWR International GmbH
(Erlangen)]

Protein-Längenstandards

Protein-Marker I ('Unstained', 'Ready-to-Use')

VWR International GmbH (Erlangen)

Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules,
USA)

Gelfiltration-Molekulargewichtstandard

Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular
Weights 12,000 - 200,000DaSigma-Aldrich Chemie GmbH
(München)

2.1.8. Lösungen und Puffer

Stammlösungen:

0,02 % Resazurin-Lösung

10 mg Resazurin wird in 50 ml aufbereitetem VE Wasser gelöst. Die Lösung wird vor der Verwendung mit einem Filtropur S 0,2µM Filter steril filtriert und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

0,08 % Triton X-100

40 µl Triton X-100 werden zu 49,96 ml aufbereitetem VE Wasser zugegeben und über Nacht unter Rühren gelöst. Die Lösung wird vor der Verwendung mit einem Filtropur S 0,45µM Filter steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

1 % Tween 80

500 µl Tween 80 werden zu 49,5 ml aufbereitetem VE Wasser zugegeben und über Nacht unter Rühren gelöst. Die Lösung wird vor der Verwendung mit einem Filtropur S 0,45µM Filter steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

20 % Tween 80

10 ml Tween 80 werden zu 40 ml aufbereitetem VE Wasser zugegeben und über Nacht unter Rühren gelöst. Die Lösung wird vor der Verwendung mit einem Filtropur S 0,45µM Filter steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

1 M DTT

1,543 g DTT wird in 10ml aufbereitetem VE Wasser gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

1 M MgCl₂

10,16 g MgCl₂ wird in 50ml VE Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

1M MnCl₂

9,9 g MnCl₂ wird in 50ml VE Wasser gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

5M NaCl

14,61 g NaCl wird in 50ml VE Wasser unter Rühren gelöst. Die Lösung wird vor der Verwendung mit einem Filtropur S 0,2µM Filter steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

33,1 mM 4-Nitrophenylacetat

120 mg 4-Nitrophenylacetat wird in 20 ml 100 % Methanol gelöst und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert.

10 mg/ml DNaseI Lösung

500 mg DNaseI Lyophilisat wird in 50 ml 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 50 % Glycerin Puffer gelöst und bei 4 °C gelagert.

Ampicillin Stammlösung

5 g Ampicillin Natriumsalz wird in 50 ml aufbereitetem VE Wasser gelöst, sterilfiltriert, in 1000 µl Portionen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

BacLight-Mischung

3,34 mM SYTO 9 und 20 mM Propidiumiodid werden zu gleichen Teilen gemischt und 1 : 10 in VE Wasser verdünnt.

BCIP

0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz wird in 10 ml 100 % Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C lichtgeschützt gelagert.

NBT

0,5 g p-Nitrotetrazoliumblausulfat wird in 10 ml 70 % Dimethylformamid gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Protease Inhibitor

5 Tabletten von SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail werden in 50 ml aufbereitetem VE Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

SYPRO® Orange Stammlösung

Die SYPRO® Orange Protein Gel Stain wird 1 : 50 in dem Puffer 10 mM HEPES (NaOH) pH 7,4 verdünnt und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert

Puffer:**Proteinreinigungs- und Lagerungspuffer:**

Zellaufschlusspuffer

20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4
500 mM NaCl
5 % (v/v) Glycerin
20 mM Imidazol

Waschpuffer

20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4
500 mM NaCl
30 % (v/v) Glycerin

Elutionspuffer	20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4 500 mM NaCl 30 % (v/v) Glycerin 500 mM Imidazol
Lagerungspuffer	20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4 500 mM NaCl 30 % (v/v) Glycerin 1 mM EDTA
<i>Stripping Buffer</i>	20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4 500 mM NaCl 50 mM EDTA
Nickel Lösung	250 mM NiSO ₄

Die Komponenten des jeweiligen Puffers werden in aufbereitetem VE Wasser gelöst und auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Der Lagerungspuffer wird vor der Verwendung in den Aktivitätstests mit einem Filtropur S 0,45 µM Filter steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Elektrophorese- und Blotting-Puffer:

Agarosegel-Elektrophorese:

Rotiphorese® 10x TBE-Puffer wird gemäß Herstellerangaben mit VE Wasser zu einer 1x Lösung verdünnt.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:

Laufpuffer

Rotiphorese® 10x SDS-PAGE wird gemäß Herstellerangaben mit VE Wasser zu einer 1x Lösung verdünnt.

Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung

20 ml 5x Roti®-Blue wird mit 20 ml Isopropanol und 60 ml VE Wasser gemischt um 100 ml 1x Gelfärbelösung zu erstellen.

Western Blot:

Äquilibrierungspuffer

60 % (v/v) Methanol
40 % (v/v) H₂O

Transferpuffer	25 mM Tris pH 8,3 192 mM Glycin 20 % Methanol 0,01 % SDS
Waschpuffer	50 mM Tris pH 7,5 100 mM NaCl
Blockierungspuffer	50 mM Tris pH 7,5 100 mM NaCl 5 % (^m / _v) Milchpulver
Inkubationspuffer	100 mM Tris pH 9,5 10 mM NaCl 5 mM MgCl ₂

CD-Spektroskopie Puffer:

Puffer 1	50 mM Tris pH 8 500 mM NaCl
Puffer 2	20 mM Tris pH 8,2 150 mM NaCl

Gelfiltrationspuffer:

20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4
150 mM NaCl
5 mM DTT

Das Reduktionsmittel DTT wurde circa 10 min vor der Verwendung des Puffers zugegeben und es wurde für jeden Lauf frischer Puffer erstellt, um bei allen Läufen dieselbe DTT-Molarität sicherzustellen.

Chloroform-Test-Lösung:

Es wird 100% Chloroform in einem 1 : 5 Verhältnis mit LB-Medium gemischt und geschüttelt um die Phasen zu vermischen. Sobald sich die Phasen getrennt haben wird das Chloroform gesättigte LB-Medium als Chloroform-Test-Lösung verwendet.

Esterase-Aktivitätstest Substratlösung:

20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4
500 mM NaCl
0,33 mM 4-Nitrophenylacetat
1 % (^v/_v) Methanol

Es wird eine 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl Pufferlösung erstellt und steril filtriert. Zu dieser Lösung wird direkt vor der Benutzung in einer 1 : 100 Verdünnung eine entsprechende Menge 33,1 mM 4-Nitrophenylacetat-Stock zugegeben.

Standard-Aktivitätstest-Puffer:

20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4

500 mM NaCl

0,25 % (v/v) Tween 80

Es wird eine 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl Pufferlösung erstellt und steril filtriert. Zu dieser Lösung wird direkt vor der Benutzung eine entsprechende Menge 20 % Tween 80 steril zugegeben.

2.1.9. Nährmedien

Lysogeny Broth (LB)-Medium:

5 g/l Bacto Hefeextrakt

10 g/l Bacto Trypton

10 g/l NaCl

LB-Agar:

5 g/l Bacto Hefeextrakt

10 g/l Bacto Trypton

10 g/l NaCl

15 g/l Bacto-Agar

Die Komponenten des LB-Mediums bzw. LB-Agars werden in VE Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wird bei 121 °C für 15 min autoklaviert. Das Selektionsantibiotikum wird direkt vor der Verwendung bzw. direkt vor dem Gießen in der entsprechenden Menge steril zugegeben.

7H9-Medium:

4,7 g/l Middlebrook 7H9 Broth (Difco)

2,33 ml/l 86 % Glycerin

2,5 ml/l 20 % (v/v) Tween 80

7H9-Agar:

4,7 g/l Middlebrook 7H9 Broth (Difco)

15 g/l Bacto-Agar

2,33 ml/l 86 % Glycerin

2,5 ml/l 20 % (v/v) Tween 80

7H9 Broth und 86 % Glycerin bzw. 7H9 Broth, 86 % Glycerin und Bacto-Agar werden in aufbereitetem VE Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wird bei 121 °C für 15 min

autoklaviert. Tween 80 wird direkt vor der Verwendung bzw. direkt vor dem Gießen in der entsprechenden Menge steril zugegeben.

SOC-Medium (Hanahan D., 1983):

0.5 % (m/v) Bacto Hefeextrakt

2 % (m/v) Bacto Trypton

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM $MgCl_2$

10 mM $MgSO_4$

20 mM Glukose

Das SOC-Medium wurde entsprechend der Anleitung von Hanahan D., 1983 erstellt.

2.1.10. Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind im Folgenden tabellarisch wiedergegeben:

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)	Merck KGaA (Darmstadt)
<i>Escherichia coli</i> NEB turbo	$F' proA^+ B^+ lac^R \Delta lacZM15 / fhuA2 \Delta(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 thi-1 \Delta(hsdS-mcrB)5$	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG (bacillus Calmette-Guérin) (Calmette A., 1931)		Prof. A. Gessner, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Regensburg
<i>Mycobacterium fortuitum</i>		
<i>Mycobacterium smegmatis</i> SMR5 (Sander P. et al., 1996)	Str^R	Prof. A. Burkovski, Lehrstuhl f. Mikrobiologie, Universität Erlangen
<i>Mycobacterium smegmatis</i> DSM 43468		Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme

2.2. Methoden

2.2.1. Anzucht und Lagerung der verwendeten Stämme

Alle verwendeten *E. coli* Stämme wurden, wenn nicht anders angegeben in LB-Medium bzw. auf LB-Agar bei 37 °C aerob angezogen. Bei der Verwendung eines Selektionsmarkers wurde 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin für die Selektion verwendet. Flüssigkulturen bis 10 ml wurden in Schraubröhrchen bei 200 Upm inkubiert und 50 ml bzw. 2l Flüssigkulturen wurden in 250 ml bzw. 5 l Erlenmeyerkolben bei 150 Upm inkubiert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte aus einer stationären Flüssigkultur in einer 1 : 1 Mischung mit sterilem 25 prozentigem Glycerin bei -80 °C (Glycerin-Lagerungskultur). Die verwendeten Stämme von *M. smegmatis* und *M. fortuitum* wurden in 7H9-Medium bzw. auf 7H9-Agar bei 37 °C aerob angezogen. Flüssigkulturen bis 10 ml wurden in Schraubröhrchen bei 200 Upm und Flüssigkulturen bis 50 ml wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben bei 150 Upm inkubiert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte aus einer stationären Flüssigkultur in einer 1 : 1 Mischung mit sterilem 25 prozentigem Glycerin bei -80 °C (Glycerin-Lagerungskultur).

Bei den am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführten Experimenten wurden die folgenden Anzuchtbedingungen gewählt: Für *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum* wurden 2 ml 7H9-Medium als Vorkultur mit einer Einzelkolonie beimpft und üN bei 37 °C inkubiert. Je 3 ml 7H9-Medium wurden mit 50 µl der Vorkultur beimpft und üN bei 37 °C inkubiert, um die für die Experimente verwendete Hauptkultur zu erhalten. Für *M. bovis* BCG wurden 25 ml 7H9-BCG-Medium, welches aus 7H9-Medium mit zusätzlich ADN, 0,2 % Glycerin und 0,25 % Tween 80 bestand, mit 5ml *M. bovis* BCG rekonstituiertem Original Lyophilisat beimpft und für 72 h bei 37 °C inkubiert. 15 ml dieser Vorkultur wurden zu 30 ml 7H9-BCG-Medium zugegeben und es wurde für 48 h bei 37 °C inkubiert, um die für die Experimente verwendete Hauptkultur zu erhalten.

2.2.2. Gentechnologische Erzeugung der benötigten Expressionsvektoren

2.2.2.1. DNA Amplifikation per Polymerase-Kettenreaktion

Zu der *in vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis K. B. and Faloona F. A., 1987; Saiki R. K. *et al.*, 1988) genutzt. Dafür wurden zwei Oligonukleotide erzeugt, eines für den plus-Strang (*Forward Primer*) und eines für den minus-Strang (*Reverse Primer*), die den zu vervielfältigenden DNA-Bereich flankieren. Die eigentliche Reaktion erfolgte unter Verwendung einer thermostabilen Polymerase durch wiederholte Zyklen aus DNA-Denaturierung, *Primer*-Anlagerung und Elongation in dem ‚Peqstar 2x gradient‘ PCR-Gerät.

Dafür wurden das folgende PCR-Programm und die folgende Reaktionszusammensetzung verwendet:

PCR-Programm			
Schritt		Temperatur	Dauer
Initiale DNA-Denaturierung		94 °C	120 s
Zyklus (30 Wiederholungen)	DNA-Denaturierung	94 °C	30 s
	<i>Primer</i> -Anlagerung	60 °C	30 s
	Elongation	72 °C	90 s
Abschließende Elongation		72 °C	600 s
Endtemperatur		10 °C	-

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung des Programmes für die PCR-Reaktionen

PCR-Reaktions-Ansatz	
Komponente	Volumen
Templat	1 µl
<i>Primer</i> [10 pmol/µl]	je 1 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl
Phusion® GC Buffer Pack	10 µl
peqGOLD dNTP-Mix [2,5 mM]	4 µl
H ₂ O (VE, autoklaviert)	27,5 µl
DMSO [50 %]	5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 4: Zusammensetzung des PCR-Reaktions-Ansatzes

Wenn mit den gezeigten Parametern kein Produkt gebildet wurde oder das Produkt aufgrund der *Primer*-Anlagerungstemperatur fehlerhaft war, wurde ein Gradient der Anlagerungstemperatur durchgeführt. Die sich ergebenden Produkte des Gradienten wurden per Agarosegel-Elektrophorese analysiert und die Temperatur mit der höchsten Amplifikation des korrekten Produktes wurde für die zukünftigen PCR-Reaktionen verwendet.

2.2.2.2. Quick-Change Mutagenese

Um gezielt Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in eine DNA-Sequenz einzuführen, wurde der Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit von New England Biolabs verwendet. Dafür wurden die Primer mit dem bereitgestellten Web-Tool NEBASECHANGER™ Version 1.2.3 erstellt und entsprechend

eingesetzt. Auch die *KLD-Reaction* wurde entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt. Die anschließende chemische Transformation erfolgte hingegen gemäß des unter 2.2.2.5. *Chemische Transformation* wiedergegebenen Protokolls.

2.2.2.3. Agarosegel-Elektrophorese und Isolierung der DNA aus den Agarosegelen

Zur Größenauftrennung von Desoxyribonukleinsäuren wurden 1 % ($^w/v$) Agarosegele in 1x TBE Puffer verwendet (Sharp P. A. *et al.*, 1973; Sambrook J. *et al.*, 1989), wobei der flüssigen Agarose vor dem Gießen Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Proben wurden im Verhältnis 6 : 1 mit Gel Loading Dye, Blue (6X) von New England Biolabs (NEB) gemischt und zusammen mit dem Längenstandard DNA Sizer III auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V konstant Mit 1x TBE als Laufpuffer durchgeführt, bis die gewünschte Trennung erreicht wurde. Die DNA wurde mit dem Clear View UV Schirm sichtbar gemacht und dem Micro Doc fotografisch dokumentiert. Für die Isolierung wurde die DNA unter UV Beleuchtung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und direkt verwendet oder vor der Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die eigentliche Aufreinigung aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Das Kit wurde ohne Modifikationen entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet, wobei als Elutionspuffer immer steriles VE Wasser gewählt wurde.

2.2.2.4. Restriktionsverdau der DNA und folgende Ligation der gereinigten Verdauprodukte

Für die spezifische dsDNA-Spaltung und für die Erzeugung von einzelsträngigen Überhängen, den *sticky-ends*, wurden Restriktionsendonukleasen verwendet (Sambrook J. *et al.*, 1989; Wilson G. G. and Murray N. E., 1991). Dafür wurden die jeweiligen palindromischen Schnittstellen mittels PCR gezielt in die DNA-Sequenzen eingeführt. Dann wurden die DNA Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gemäß der in der Tabelle 5 wiedergegebene Reaktionszusammensetzung inkubiert. Dieser Restriktions-Verdau wurde bei 37 °C für 1 h durchgeführt und anschließend wurden die erzeugten Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese untersucht. Die für die Klonierung benötigten DNA-Fragmente, das geschnittene Plasmid ohne das entsprechende MCS-Stück und das geschnittene *Insert*, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wurde aus dem Gel aufgereinigt (siehe 2.2.2.3. *Agarosegel-Elektrophorese und Isolierung der DNA aus den Agarosegelen*).

Restriktions-Verdau-Ansatz	
Komponente	Volumen
dsDNA	20 µl
Restriktionsendonuklease 1	1 µl
Restriktionsendonuklease 2	1 µl
BSA, Molecular Biology Grade [10x]	5 µl
CutSmart® Buffer [10x]	5 µl
H ₂ O (VE, autoklaviert)	18 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 5: Zusammensetzung des Restriktions-Verdau-Ansatzes

Die Ligation des geschnittenen Plasmids und des geschnittenen *Inserts* wurde dann mit der T4 DNA Ligase von New England Biolabs mit der in der Tabelle 6 wiedergegebenen Reaktionszusammensetzung durchgeführt, wobei nur solche Fragmente ligiert werden, die komplementäre *sticky-ends* aufweisen (Ausubel F. M. *et al.*, 1987). Um eine mögliche Religation des geschnittenen Plasmids zu prüfen, wurde für jedes verwendet Plasmid ein Kontrollansatz ohne verdautes *Insert* erstellt. Die eigentliche Ligations-Reaktion erfolgte bei RT für 2 h und nach dieser Inkubationszeit wurde der gesamte Ansatz für die Transformation in chemisch kompetente Zellen verwendet (siehe 2.2.2.5. Chemische Transformation).

Ligations-Ansatz	
Komponente	Volumen
Geschnittenes Plasmid	2 µl
Geschnittenes <i>Insert</i>	8 µl
T4 DNA Ligase Reaction Buffer [10x]	2 µl
T4 DNA Ligase	2 µl
H ₂ O (VE, autoklaviert)	6 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung des Ligations-Ansatzes

2.2.2.5. Chemische Transformation

Die Transformation wurde mit einem nach Inoue H. *et al.*, 1990 abgewandeltem Protokoll durchgeführt. 80 µl chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und entweder mit dem kompletten Ligationsansatz versetzt oder es wurden je 5 µl der kompetenten Zellen mit 1 µl aufgereinigtem Vektor versetzt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert und die Aufnahme der DNA erfolgte durch einen 45 s Hitzeschock bei 42 °C. Direkt danach wurden die Zellen für weitere 5 min auf Eis gelagert und es wurde je 200 µl SOC Lösung zugegeben. Die Zellen wurden dann zum Kuren für 1 h bei 37 °C mit 400 Upm inkubiert. Nach dem Kuren wurden 200 µl der Zell-Suspension auf LB-Agar mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.6. Plasmid Präparation aus *E. coli*

Für die Plasmid Präparation aus *E. coli* wurde eine Kolonie von der Platte abgenommen und damit eine 2 ml LB-Medium Flüssigkultur beimpft. Diese Flüssigkultur wurde mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum versetzt und üN bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Diese üN-Kultur wurde für den peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I von peqlab und der Kit ohne Modifikationen entsprechend des Herstellerprotokolls verwendet, wobei als Elutionspuffer immer steriles VE Wasser gewählt wurde. Anschließend wurde die Sequenz des Inserts in der MCS per Sequenzierung durch die Firma GeneArt AG (Regensburg) bestimmt. Dafür wurden die von der GeneArt AG angebotenen Primer T7-Promotor und T7-Terminator gewählt.

2.2.3. Rekombinante Proteinexpression

Für die rekombinante Proteinexpression wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit dem jeweiligen pET Expressionsvektor, der das Zielprotein codiert, transformiert (Studier F. W. and Moffatt B. A., 1986; Rosenberg A. H. *et al.*, 1987) und auf LB-Agar mit dem jeweiligen Selektionsmedium ausplattiert. Von diesen Platten wurden mehrere Kolonien abgenommen und damit eine 50 ml LB-Medium Vorkultur angeimpft, welche mit Selektionsantibiotikum versetzt und üN bei 37 °C und 150 Upm inkubiert wurde. Mit jeweils 25 ml der üN-Kultur wurden 2 l mit Selektionsantibiotikum versetzten LB-Medium beimpft und die Expressionskultur wurde bei 37 °C und 150 Upm inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,6 - 0,8 erreicht wurde. Die Zellen wurden dann entweder mit 1 mM IPTG induziert und für weitere 4 h bei 37 °C und 150 Upm inkubiert oder auf 16 °C heruntergekühlt, mit 0,25 mM IPTG induziert und üN bei 16 °C und 150 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 g für 5 min bei 4 °C pelletiert und die Zellpellets wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4. Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine

2.2.4.1. Zellaufschluss, Überstandsklärung und His-Tag Affinitätschromatographie

Pellet entsprechend der Zellmasse von 1 l Expressionskultur wurde in ein 50 ml Schraubröhrchen gegeben. Das Pellet wurde dann in 45 ml Zellaufschlusspuffer durch Vortexen gelöst und mit 100 µl DNase I Stammlösung, 100 µl 1 M MgCl₂ und 100 µl 1 M MnCl₂ versetzt. Für die Lysine B wurde zudem jeweils 1 ml Protease Inhibitor Stammlösung zugegeben.

Anschließend wurden die Zellen gekühlt im Eiswasser per Ultraschall aufgeschlossen, wobei das folgende Programm verwendet wurde:

Ultraschall-Zellaufschluss-Programm		
Schritt	Amplitude	Dauer
Beschallung	45 %	10 s
Pause	-	20 s
Gesamtdauer	300 s	

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung des Ultraschall-Zellaufschluss Programmes

Danach wurde das Lysat bei 15000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, um die Zellfragmente und unlöslichen Bestandteile als Pellet abzutrennen. Das geklärte Lysat wurde dann mit einem Filtropur S 0,2µm Filter sterilfiltriert und anschließend als Auftrag für die His-Tag Affinitätschromatographie verwendet.

Für die Affinitätschromatographie wurden folgende Parameter gewählt:

Flussrate	5 ml/min
Maximal zulässiger Druck	5 bar

Es wurden HiTrap IMAC Sepharose FF (5ml) oder HisTrap excel (1ml) His-Tag Affinitätssäulen an einer ÄKTA Explorer oder einer ÄKTA Prime plus Chromatographie-Anlage verwendet.

Für die Proteinreinigung wurde die His-Tag Affinitätssäule mit Zellaufschlusspuffer equilibriert, bis eine stabile OD_{280nm} erhalten wurde (1). Dann wurde das OD_{280nm} Signal mit der *autozero* Funktion auf 0 gesetzt und der Auftrag begonnen, wobei das filtrierte Lysat über die Säule gepumpt und der Durchlauf gesammelt wurde (2). Dabei wurden alle Proteine, die unter diesen Bedingungen an die durch das Säulenmaterial komplexierten Nickelionen binden können, an dem Säulenmaterial immobilisiert, wobei durch die verwendete Imidazol-Konzentration im Zellaufschlusspuffer die unspezifische Proteinbindung reduziert wurde. Anschließend wurde der Auftragsschlauch mit circa 20 ml Zellaufschlusspuffer nachgespült und es wurde Zellaufschlusspuffer über die Säule gepumpt, bis die OD_{280nm} 10 mAu, bzw. 20 mAu bei überschrittener Säulenkapazität erreicht wurde (3). Danach wurde Waschpuffer über die Säule gepumpt (4), bis die pufferbedingte Änderung der OD_{280nm} erfolgt war und das Signal sich wieder stabilisiert hatte (5). Für die Elution des gebundenen Proteins wurde ein Puffergradient von 0 bis 100 % Elutionspuffer mit einer Länge von 15 min, d.h. 75 ml durchgeführt (6). Während des Gradienten wurden die verschiedenen, eluierten Proteinfraktionen mittels des Probensammlers gesammelt und anschließend bei 4 °C gelagert. Zur Identifizierung der Proteinfraktion, die das Zielprotein enthielt, wurde von der unlöslichen Fraktion des Lysats, von der löslichen Fraktion des Lysats, von dem Durchlauf des Auftrags und von allen Proteinfraktionen je 40 µl für die Analyse durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet. Nach der Analyse wurde das Zielprotein bei 4 °C in den Lagerpuffer dialysiert, wobei der Dialysefaktor mindestens 1 : 1000 betrug, und alle anderen Proteinfraktionen verworfen.

Abschließend wurde die HiTrap IMAC Sepharose FF (5ml) His-Tag Affinitätssäule gereinigt. Dafür wurde zuerst aufbereitetes VE Wasser über die Säule gepumpt, um den Puffer zu entfernen. Dann

wurde *Stripping Buffer* verwendet, um die komplexierten Nickel-Ionen abzulösen. Auch dieser Puffer wurde mit Wasser verdrängt und anschließend 1 M NaOH über die Säule gepumpt und die Pumpen, Schläuche und das Säulenmaterial dann 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Natronlauge mit Wasser entfernt und die Säule mit Nickel-Lösung überspült, um das Säulenmaterial mit Nickel-Ionen zu beladen. Abschließend wurde die Nickel-Lösung mit VE Wasser verdrängt und das beladene Säulenmaterial zur Lagerung in 20 % Ethanol gelegt.

2.2.4.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western Blot

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese verwendet (Laemmli U. K., 1970; King J. and Laemmli U. K., 1971). Dafür wurde in das *Mini Protean Tetra System* ein vorgefertigte *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel Any kD, 12-well* SDS-Polyacrylamidgel eingespannt und die Gelappertemperatur entsprechend der Herstellerangaben mit Laufpuffer gefüllt. Für die Probenvorbereitung wurden 40 µl Analytlösung mit 10 µl Roti®-Load 1 gemischt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. 10 µl bis 20 µl der erhaltenen Probenlösungen wurden zusammen mit dem Standard, also *Protein-Marker I* für die Coomassie-Brilliantblau-Proteinfärbung bzw. *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* für den Western Blot auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 45 mA konstant pro Gel für 35 min durchgeführt. Danach wurde das Gel einmal mit VE Wasser gewaschen und anschließend für die Coomassie-Brilliantblau-Proteinfärbung oder für den Western Blot verwendet.

Für die Proteinfärbung wurde das Gel circa 1 min in 1x Coomassie-Brilliantblau-Färbelösung aufgekocht und anschließend 20 - 120 min bei RT unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert. Danach wurde das Gel mit VE Wasser gewaschen und in VE Wasser bei RT unter Schütteln inkubiert, bis der gewünschte Entfärbungsgrad des Gels erreicht war. Die Dokumentation der angefärbten Proteine erfolgte mit einem Hp L1957A Scanner. Die erhaltenen Bilder wurden mit der Software Paint.NET v3.5.11 bearbeitet.

Der Western Blot (Towbin H. *et al.*, 1979) wurde zum Nachweis eines Proteins durch die Bindung eines für dieses Protein spezifischen Antikörpers durchgeführt. Dafür wurde eine *Perfect Blue Semi-Dry Elektrophoretic Blotting Apparatus* verwendet. Als Vorbereitung wurden sechs *Grade 3MM Chr Cellulose Chromatography Papers* Filterpapier in Transferpuffer getränkt. Zusätzlich wurde eine *PVDF Blotting-Membran 0.45 µm 0.3 x 3.0 m* erst in Äquilibrierungspuffer und dann in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde der Blotting Ansatz wie folgt aufgebaut:

Die unterste Lage bildeten drei Filterpapiere und darauf wurde die Membran gelegt. Auf die Membran wurde das SDS-Polyacrylamidgel und auf das Gel eine weitere Lage aus drei Filterpapieren gelegt.

Die Apparatur wurde dann geschlossen und es wurde bei 86 mA konstant für 55 min geblottet. Anschließend wurde die Blotting-Membran mit einer Pinzette aus dem Aufbau entnommen und bei RT für 30 min unter Schütteln in 15 ml Blockierungspuffer inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden 3 µl *Kaninchen Anti-HIS Tag* Antikörper zu dem Blockierungspuffer zugegeben. Es wurde durch Schwenken gemischt und bei RT für weitere 30 min unter Schütteln inkubiert. Dann wurde die Antikörperlösung mit Waschpuffer abgespült und die Membran wurde drei Mal bei RT für 10 min unter Schütteln in circa 20 ml Waschpuffer inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Membran mit der zweiten Antikörperlösung, 3 µl *Ziege Anti-Kaninchen-IgG AK AP-Konjugat* in 15 ml Blockierungspuffer, bei RT für 30 min unter Schütteln inkubiert und wurde anschließend erneut drei Mal bei RT für 10 min unter Schütteln in circa 20 ml Waschpuffer inkubiert. Für die Detektion wurden 65 µl BCIP und 65 µl NBT in Inkubationspuffer gelöst und die Membran wurde lichtgeschützt bei RT mit dieser Inkubationslösung inkubiert. Nach dem Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde die Inkubationslösung abgenommen und die Reaktion durch Inkubation der Membran in VE Wasser gestoppt. Die Dokumentation der Banden erfolgte mit einem Hp L1957A Scanner und die erhaltenen Bilder wurden mit der Software Paint.NET v3.5.11 bearbeitet.

2.2.5. Charakterisierung der rekombinant hergestellten Proteine

2.2.5.1. Nah-UV-Spektroskopie

In der Nah-UV-Spektroskopie wird die unterschiedlich starke UV-Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, sowie der Disulfidbrücken (Cystine) für die Bestimmung der Proteinkonzentration bzw. der Proteinmolarität genutzt.

Dafür wird aus der Aminosäuresequenz, gemäß der von Pace (Pace C. N. *et al.*, 1995) definierten Formel, der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$ des Proteins berechnet:

$$\epsilon_{280\text{nm}} = \sum \text{Trp} \cdot 5500 + \sum \text{Tyr} \cdot 1490 + \sum \text{Cystine} \cdot 125; [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$$

$\epsilon_{280\text{nm}}$:	molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $[\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$
$\sum \text{Trp}$:	Summe der Tryptophane des Proteins
$\sum \text{Tyr}$:	Summe der Tyrosine des Proteins
$\sum \text{Cystine}$:	Summe der Disulfidbrücken des Proteins

Gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz lässt sich damit die Proteinmolarität aus der Absorption bei 280 nm bestimmen:

$$\text{Abs}_{280\text{nm}} = \epsilon_{280\text{nm}} \cdot c \cdot d \quad \leftrightarrow \quad c = \text{Abs}_{280\text{nm}} / (\epsilon_{280\text{nm}} \cdot d); [\text{M/l}]$$

$\text{Abs}_{280\text{nm}}$:	gemessene Absorption bei 280 nm
$\epsilon_{280\text{nm}}$:	molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $[\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$
c :	Molarität des Proteins in $[\text{M/l}]$
d :	Schichtdicke der Küvette in $[\text{cm}]$

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird aus dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{nm}}$ der spezifische Extinktionskoeffizient $^{0,1\%}\text{Abs}_{280\text{nm}}$ berechnet:

$$^{0,1\%}\text{Abs}_{280\text{nm}} = \epsilon_{280\text{nm}} / \text{MW}; [\text{cm}^2/\text{mg}]$$

$^{0,1\%}\text{Abs}_{280\text{nm}}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $[\text{cm}^2/\text{mg}]$

$\epsilon_{280\text{nm}}$: molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $[\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$

MW: Molekulargewicht des Proteins

Mit $^{0,1\%}\text{Abs}_{280\text{nm}}$ wird die Proteinkonzentration wie folgt berechnet:

$$c = (\text{Abs}_{280\text{nm}}) / (^{0,1\%}\text{Abs}_{280\text{nm}} \cdot d); [\text{g/l}]$$

c: Konzentration des Proteins in $[\text{g/l}]$

$\text{Abs}_{280\text{nm}}$: gemessene Absorption bei 280 nm

$^{0,1\%}\text{Abs}_{280\text{nm}}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $[\text{cm}^2/\text{mg}]$

d: Schichtdicke der Küvette in $[\text{cm}]$

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration bzw. der Proteinmolarität wurde zunächst eine *Blank*-Messung mit dem jeweiligen Puffer durchgeführt. Dann wurden Spektren von 240 bis 340 nm aufgenommen und aus den Spektren wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Berechnung der benötigten Extinktionskoeffizienten wurde mit dem Webtool Protparam (Gasteiger E. *et al.*, 2003) durchgeführt. Danach wurde aus der erhaltenen Absorption bei 280 nm und dem Extinktionskoeffizienten entsprechend der angegebenen Formeln die Konzentration bzw. die Molarität berechnet.

Zudem konnte anhand der lichtstreuungsbedingten Absorption bei 330 nm eine eventuelle Aggregation des Proteins beurteilt werden.

2.2.5.2. Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie

Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) basiert auf den Wechselwirkungen von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen wie Proteinen, die wegen ihrer unterschiedlichen Brechungsindizes für rechts- und links-polarisiertes Licht eine Phasenverschiebung erzeugen. Zudem unterscheiden sich bei optisch aktiven Substanzen die Extinktionskoeffizienten für rechts- und links-polarisiertes Licht, was zu elliptisch polarisiertem Licht führt, wobei diese Elliptizität (θ_{obs}) bei CD-Messungen als Signal verwendet wird.

Bei Proteinen bestimmen die Peptidbindungen die Absorption im Wellenlängenbereich von 170 nm bis 250 nm und deswegen ermöglichen diese Teile des Spektrums Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins. Dabei besitzen die verschiedenen Sekundärstrukturelemente α -Helix, β -Faltblatt oder *random coil* charakteristische und stark unterschiedliche CD-Spektren (Johnson W. C., Jr., 1990), aus denen sich das Proteinspektrum zusammensetzt (Stark G. R., 1965).

Für die Messungen wurde eine *Type 31B Twin port, Micro Cells with Short Pathlength, 0.2mm, Far UV Quartz* Küvette in dem *Jasco Circular Dichroismus Spektropolarimeter J-815* verwendet. Dafür wurden die folgenden Parameter gewählt:

Start-Wellenlänge: 260 nm; End-Wellenlänge: 190 nm; Temperatur: RT

Control Sensor: Holder; Monitor Sensor: Cell; Shutter Control: Auto

Start Mode: Start immediately

Photometric Mode: CD, HT, Abs; Cell Length: 10 mm; Sensitivity: Standard; D.I.T.: 2 sec; Bandwidth: 1.00 nm;

Baseline Correction: None; Data array type: Non-linear data array * 3; Measure Range: 260 - 190 nm; Data pitch: 1 nm; Scanning Speed: 50 nm/min; Accumulations: 3; Data interval: 1 nm

CD Detector: PMT; PMT Voltage: Auto

Die erhaltenen Spektren wurden mit dem Spectra Manager Version 2.09.01 *Smoothing Tool: Savitzky-Golay smoothing* mit dem Parameter *convolution width 9* geglättet. Zudem wurde das Pufferspektrum von den Proteinspektren subtrahiert, um das Puffersignal zu entfernen. Danach wurden die Spektren für die weitere Bearbeitung exportiert.

Anschließend wurde, um eine Vergleichbarkeit der Spektren zu gewährleisten, die θ_{obs} in die molare Elliptizität pro Aminosäure θ_{MRW} gemäß der folgenden Formel umgerechnet:

$$\theta_{\text{MRW}} = (\theta_{\text{obs}} \cdot 100 \cdot \text{MW}) / (c \cdot d \cdot N_A)$$

θ_{MRW} :	durchschnittliche Elliptizität pro Aminosäure in [$^{\circ} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$]
θ_{obs} :	gemessene Elliptizität in [m°]
c:	Konzentration der Proteinlösung in [mg/ml]
d:	Schichtdicke der Küvette in [cm]
MW:	Molare Masse des Proteins in [kDa]
N_A :	Anzahl der Aminosäuren

Eine weitere Anwendung der CD-Spektroskopie ist die Bestimmung des Schmelzpunktes T_m eines Proteins anhand der Signaländerung bei einer Wellenlänge, die einen signifikanten Unterschied zwischen nativem und denaturiertem Protein aufweist, z.B. bei dem Minimum der α -Helix bei 220 nm. Dazu wird ein Temperaturgradient durchgeführt, bei dem in regelmäßigen Intervallen die $\theta_{220\text{nm}}$ bestimmt wird. Die Abnahme der $\theta_{220\text{nm}}$ zeigt eine Abnahme des Sekundärstrukturgehaltes und damit die Entfaltung des Proteins. Für die Bestimmung des Schmelzpunktes werden die erhaltenen $\theta_{220\text{nm}}$ Werte gegen die entsprechenden Temperaturen des Gradienten aufgetragen und man erhält dadurch eine Entfaltungskurve, aus der T_m anhand des Übergangsmittelpunktes bestimmt wird.

Für die Messungen zur Schmelzpunktbestimmung wurden *Hellma Makro-Küvette 110-QS* mit Stopfen und 1 mm Schichtdicke in dem *Jasco Circular Dichroismus Spektropolarimeter J-815* mit PTC-423S verwendet.

Dabei wurden die folgenden Parameter gewählt:

Start-Temperatur: 20 °C; End-Temperatur: 90 °C; Heizgeschwindigkeit: 1 °C/min

Control Sensor: Holder; Monitor Sensor: Cell; Shutter Control: Auto

Start Mode: Keep target temperature +/-0.10 deg C while 5 seconds

Photometric Mode: CD, HT, Abs; Cell Length: 10 mm; Sensitivity: Standard; D.I.T.: 1 sec; Bandwidth: 1.00 nm;

Monitor Wavelength: 220 nm; Baseline Correction: None; Data array type: Non-linear data array * 3

CD Detector: PMT; PMT Voltage: Auto

Der Schmelzpunkt wurde mit dem Spectra Manager Version 2.09.01 aus der erhaltenen Entfaltungskurve ermittelt. Zudem wurde bei der Start-Temperatur und bei der End-Temperatur ein CD-Spektrum von 190 nm bis 260 nm aufgenommen, um die Entfaltung des Proteins anhand des Vergleichs der Spektren zu prüfen.

2.2.5.3. Analytische Gelfiltrationschromatographie

Mit der analytischen Gelfiltrationschromatographie lässt sich, bei bekanntem Molekulargewicht des Monomers, der Oligomerisierungszustand von Proteinen bestimmen. Dazu wird das erhaltene Retentionsvolumen unter Verwendung einer Kalibrierungsgeraden in das apparente Molekulargewicht umgerechnet, wobei jedoch abhängig von der Form des Proteins Differenzen zum realen Molekulargewicht auftreten können.

Zur Messung wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule auf einer ÄKTA Explorer Anlage mit 0,6 ml/min Flußrate bei einem Drucklimit von 1 MPa verwendet, wobei die Säule vor den Messungen mit drei Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer equilibriert wurde. Für jede Messung wurde der Puffer zudem durch frisch erstellten Puffer ersetzt, der aus denselben Stock-Lösungen angesetzt wurde, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Der Auftrag auf die Säule erfolgte über einen 100 µl Loop, der vollständig mit Analytlösung befüllt wurde.

Zuerst wurde mit *Blue Dextran* und den Referenz-Proteinen Albumin, *Carbonic Anhydrase* und *Cytochrome C* aus dem *Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12,000 - 200,000Da* Kit von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München), gemäß der Herstellerangaben das Ausschlussvolumen bestimmt und die Kalibrierungsgerade erstellt.

Die zu analysierenden Proteine wurden vor der Verwendung in den Gelfiltrationspuffer ohne DTT dialysiert und 30 min für die Einzelproteine, bzw. 60 min für die Proteinmischungen vor der Messung mit einer entsprechenden Menge DTT versetzt und bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Proteinlösung in den Auftragsloop geladen und die Messung durch Injektion gestartet. Die Abs_{280nm} der erhaltenen Chromatogramme wurde danach in der Software Unicorn Version 5.11 Build 407 mit den Parametern *smooth filter type moving average; filter width 50* geglättet und die Baseline-Anpassung wurde mit den Parametern: *Baseline structure width 3; noise window 0,1; minimum distance between points 3*

durchgeführt. Aus den bearbeiteten Chromatogrammen wurden die Retentionsvolumen der einzelnen *Peaks* bestimmt. Die Chromatogramme wurden zudem überlagert, um Darstellungen des direkten Vergleichs zu erhalten.

Für die Reinigung der Säule wurde zuerst der Puffer durch aufgereinigtes VE Wasser verdrängt und dann mit 1M NaOH gewaschen. Die Natronlauge wurde wiederum durch aufgereinigtes VE Wasser verdrängt und die Säule wurde abschließend in 20 % Ethanol gelagert.

2.2.5.4. **Fluorescence based Thermal Shift Assay (FTSA)**

Bei dem FTSA (Niesen F. H. *et al.*, 2007) wird die Veränderung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes SYPRO® Orange genutzt, der durch Wasser gequencht wird und unspezifisch an hydrophobe Bereiche von Proteinen bindet. Dafür wird eine thermische Entfaltung des Proteins durchgeführt, wobei hydrophobe Bereiche Lösungsmittel- und damit Farbstoffzugänglich werden, was zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt. Durch eine Auftragung der Temperatur gegen die Fluoreszenzintensität erhält man eine Entfaltungskurve, aus der sich der Schmelzpunkt des Proteins bestimmen lässt.

Diese Methodik wurde genutzt, um den Einfluss verschiedener Pufferbedingungen auf das zu testende Protein im Hochdurchsatz zu bestimmen. Dabei wurde für die Bestimmung des Effektes des Puffersystems und des pHs das Slice pH Kit von Hampton Research Corp. verwendet:

TSFA-Ansatz	
Komponente	Volumen
100x SYPRO® Orange	1 µl
1M Puffer Stock (Slice pH Kit)	2 µl
Protein-Lösung (2 mg/ml)	1 µl
H ₂ O (VE, aufbereitet)	16 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 8: Zusammensetzung der Thermal Shift Fluorescence Assay Ansätze

Die Ansätze wurden in 4titutde Frame Star 384 Platten erstellt und mit 4titutde Q PCR Adhesive Clear Seals luftdicht verschlossen. Dann wurden die Entfaltungskurven in einem qPCR Gerät unter Verwendung des Detektors ROX gemessen und die Daten wurden für die weitere Bearbeitung exportiert. Für die Analyse wurde die halbmaximale Signalintensität von Beginn der Messung bis zu dem Maximum des Temperaturübergangs als Schmelzpunkt definiert und die Puffer wurden entsprechend dieses Kriteriums verglichen.

Für den Vergleich des Effektes verschiedener Natriumchlorid-Molaritäten wurde zu den Ansätzen eine entsprechende Natriumchlorid-Lösung, statt aufbereitetem VE Wasser, zugegeben, um die im Ansatz gewünschte Molarität zu erhalten. Die Messung und Auswertung wurde nicht verändert.

2.2.5.5. Nano DSF

Bei der NanoDSF Methode von NanoTemper Technologies GmbH (München) wird die Lösungsmittelabhängigkeit des Fluoreszenzsignals der Aminosäure Tryptophan genutzt. Dabei lässt sich aus der Veränderung des Fluoreszenzsignals die Schmelztemperatur bestimmen.

Es wurde 2 μ M der Proteine D29gp12, D29gp12-H-pK34 und pK34-D29gp12-H in Lagerungspuffer für die Messungen verwendet. Die Proben wurden direkt vor der Messung in die Kapillaren eingebracht und wurden von der Firma 2bind GmbH (Regensburg) vermessen. Die anschließende Auswertung der Schmelzkurven erfolgte entsprechend der von 2bind angegebenen Kriterien.

2.2.6. Bioinformatische Vorhersage thermisch stabilisierender D29gp12-Mutanten

Für die Bestimmung möglicher stabilisierender Mutationen wurden die zwei Tools ‚mCSM‘ (Pires D. E. *et al.*, 2014b) und ‚DUET‘ (Pires D. E. *et al.*, 2014a) genutzt. Dabei wurden die Prozesse und die Auswertungen von Patrick Löffler (Universität Regensburg, Biochemie II) durchgeführt.

Mittels mCSM wurde die Stabilitätsänderung aller möglichen Punktmutationen an allen Proteinpositionen des Lysins B D29gp12 [PDB Eintrag: 3HC7] berechnet. Um eine höhere Robustheit zu erzeugen, wurde zusätzlich ein Strukturensamble über Molekular-Dynamik-Simulationen der Kristallstruktur des wildtypischen Proteins erzeugt, wobei der Effekt jeder Mutation über mehrere Strukturen gemittelt wurde. Zudem wurden mit dem Web Server DUET über einen *Web Scraper* alle möglichen Mutationen an allen Proteinpositionen berechnet, wobei aus Gründen der Rechenzeit nur die Kristallstruktur des wildtypischen D29gp12 verwendet wurde. Dann wurde eine Auswahl der Mutationen mit dem höchsten vorhergesagten stabilisierenden Effekt von Dr. Heike Stürer (Universität Regensburg, Biochemie II) in D29gp12 gentechnisch eingeführt. Die Schmelzpunkte der rekombinant produzierbaren Varianten wurden danach experimentell bestimmt.

2.2.7. Bestimmung der *in vitro* Enzymaktivität

2.2.7.1. Chloroform Test: Bestimmung der Lysin A Aktivität

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der verschiedenen Lysine A wurde eine von Henry M. *et al.*, 2010 abgeleitete Methode verwendet.

Das zu testende Protein wurde in dem Expressionsvektor pET-21 in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Damit wurden 2 ml LB-Medium Vorkulturen angeimpft, welche mit Selektionsantibiotikum versetzt und üN bei 37 °C und 150 Upm inkubiert wurden. Mit jeweils 200 μ l der üN-Kultur wurden 2 ml mit Selektionsantibiotikum versetztes LB-Medium beimpft und diese Testkultur wurde bei 37 °C und

150 Upm inkubiert, bis eine OD_{600nm} von circa 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden dann mit 1 mM IPTG induziert, wobei die Kontrollzellen nicht induziert wurden, und für weitere 4 h bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Kulturen vermessen und alle Kulturen auf dieselbe OD_{600nm} eingestellt. Dann wurden jeweils 500 µl der Zellschlamm-Lösung pro Küvette vorgelegt und es wurde die Abs_{600nm} im Jasco V-650 Photometer bei RT gemessen. Nach der Stabilisierung der Absorption wurde zu jeder Küvette 500 µl Chloroform-Test-Lösung zugegeben: Die Ansätze wurden dann durch zweimaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt. Die Abs_{600nm} wurde danach weiter vermessen und die erhaltenen Messdaten für die Analyse exportiert.

Für die Auswertung der Daten wurde nur das Intervall nach dem Mischen mit Chloroform-Test-Lösung verwendet, wobei der Zeitpunkt 5 min gewählt wurde, da dort keine Störung des Signals durch das Pipettieren mehr vorhanden war. Es wurde dann die Änderung der Abs_{600nm} in einem Zeitintervall von 10 min, d.h. Zeitpunkt 5 - 15 min, der induzierten Proben mit der Änderung des Signals der Negativkontrollen, den nicht induzierten Proben, verglichen. Dabei zeigte eine höhere Abnahme der Absorption eine stärkere Lyse der Zellen, woraus eine peptidoglykanabbauende Aktivität des getesteten Proteins gefolgert wurde.

2.2.7.2. Esterase-Aktivitätstest: Bestimmung der Lysin B Aktivität

Um die *in vitro* Aktivität der verschiedenen Lysine B zu bestimmen wurde eine von Gilham D. und Lehner R., 2005 abgewandelte Methode verwendet.

In 96 Well Platten wurde für jeden Ansatz 20 µl einer 1 µM Proteinlösung vorgelegt, wobei die Proteine mit Lagerungspuffer auf dieselbe Molarität eingestellt wurden. Lysozym diente als Negativkontrolle, für die kein enzymatischer Umsatz beobachtet wird. Die Lipase aus *P. fluorescens* (Lipase (*P.fluorescens*) bzw. Lipase) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Direkt vor der Messung wurde dann die Esterase-Aktivitätstest-Substratlösung vorbereitet.

Für die Messungen wurde jeweils 180 µl 0,33mM 4-Nitrophenylacetat Substratlösung zu der Proteinlösung zugegeben, was einer 10 : 1 Verdünnung entsprach, wobei die Ansätze durch zweimaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt wurden. Anschließend wurde in dem ELISA Reader Tecan infinite M200Pro die OD_{420nm} für 60 Zyklen bestimmt, wobei jeder Zyklus eine Dauer von 77,3 s hatte. Aus den erhaltenen OD Werten wurde die enzymatische Aktivität anhand des Umsatzes von 4-Nitrophenylacetat und der daraus resultierenden Zunahme der OD_{420nm} bestimmt. Dabei wurden aber keine enzymatischen Parameter, sondern nur der Umsatz der Proteine relativ zu einander betrachtet.

2.2.8. Bestimmung der Aktivität auf lebenden Mykobakterien

2.2.8.1. Standard-Aktivitätstest: Bestimmung der Lebendkeimzahl unter Verwendung serieller Verdünnungen

Die Bestimmung der lebenden Zellen in einer Lösung durch serielle Verdünnung ist eine Grundlagen-Methode der Mikrobiologie (Goldman E. and Green L. H., 2008). Für diese Arbeit wurde die folgende Abwandlung dieser Methode verwendet.

Um die nötige Zelldichte zu erreichen, wurde als Vorkultur 50 ml 7H9-Medium mit *M. smegmatis* SMR5 oder *M. fortuitum* beimpft und 72 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellzahl in der Vorkultur wurde mit einer Thoma CE 0,02mm Tiefe 0,0025mm² Zählkammer bestimmt, wobei eine 1 : 100 Verdünnung für die Zählung eingesetzt wurde. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 3000 g für 45 min bei 4 °C in 50 ml Schraubröhrchen pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets durch dreimaliges Auf- und Ab-Pipettieren mit 10 ml serologischen Pipetten in Standard-Aktivitätstest-Puffer auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen pro ml resuspendiert.

Für die Inkubation der Zellen mit den zu testenden Proteinen wurden alle Ansätze in sterilen 2,2 ml 96 Well Platten erstellt und inkubiert, wobei für jeden Ansatz je 400 µl Protein-Lösung und 400 µl Zell-Suspension verwendet wurden.

Die Protein-Lösung bestand für jeden Ansatz aus dem Puffer 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl, 30 % Glycerin 1mM EDTA und 10 µM jedes zu testenden Proteins, was eine finale Molarität von 5 µM im Gesamtansatz ergab.

Für alle Ansätze wurde zuerst die Protein-Lösung in den Wells vorgelegt und anschließend die Zell-Suspension zugegeben. Es wurde durch fünfmaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und dann für 4 h bei RT inkubiert. Danach wurde zu den Lysin B Vorinkubationsansätzen das Lysin A in der entsprechenden Menge zugegeben und alle Ansätze wurden erneut durch Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und für weitere 16 h bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die serielle Verdünnung wie folgt erstellt:

Es wurden je 360 µl Standard-Aktivitätstest-Puffer in sterilen 2,2 ml 96 Well Platten vorgelegt. Aus dem Probenansatz, auch als 10^0 bezeichnet, wurden, nach dem Mischen durch zehnmaliges Auf- und Ab-Pipettieren, 40 µl abgenommen und in die erste Verdünnung, d.h. 10^{-1} , gegeben. Nach der Zellzugabe wurde durch zwanzigmaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt, wodurch ein Verdünnungsfaktor von 1 : 10 erhalten wurde. Diese Vorgehensweise wurde für alle folgenden Verdünnungen durchgeführt und die Verdünnungsreihe wurde von 10^0 bis 10^{-7} erstellt.

Von jedem Ansatz der Verdünnungsreihe wurden anschließend 200 µl nach Mischen durch fünfmaliges Auf- und Ab-Pipettieren, auf 7H9-Agar ausplattiert. Danach wurden die Platten für 2 h bei RT getrocknet und dann für 72 h bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) durch Auszählen der sichtbaren Kolonien bestimmt. Dabei wurde bis zu einer Kolonienzahl von 500 die gesamte Platte ausgezählt und bis zu einer Kolonienzahl von 5000 wurden Plattensegmente ausgezählt. Bei höheren Kolonienzahlen wurden die Platten als nicht auszählbar gewertet und nur zwischen Kolonien und geschlossenem Rasen unterschieden. Aus den gezählten Kolonienzahlen wurde dann der KBE Wert jedes Ansatzes bestimmt. Anschließend wurde die Reduktion der KBE anhand des Vergleiches mit der Puffer-Kontrolle, die als Negativkontrolle diente ermittelt und als logarithmische Reduktion (\log_{10} Reduktion) wiedergegeben.

2.2.8.2. Bestimmung der Reporter-gen-Kopienzahl mittels PMA-basierter PCR-Inhibition und qPCR

Die im Folgenden beschriebene Methode und die zugehörigen Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Bei dieser Methode wird die Interkalierung von Propidium Monoazid (PMA) in die DNA genutzt, das durch Photo-Aktivierung kovalent an die DNA gebunden werden kann. Da PMA keine intakten Membranen überwinden kann, erlaubt diese Methode die Unterscheidung von lebenden Zellen mit intakter Membran und Zellen mit geschädigten Membranen, also nicht lebensfähigen Zellen (Nocker A. *et al.*, 2006; Filion M., 2012).

Um die nötigen Zelldichten zu erreichen wurden Vor- und Hauptkulturen entsprechend 2.2.1. *Anzucht und Lagerung der verwendeten Stämme* erstellt. Die Zellzahl der erhaltenen Hauptkulturen wurde durch die OD_{600nm} bestimmt.

Dafür wurden die folgenden Umrechnungsfaktoren verwendet:

Umrechnungsfaktoren: Optische Dichte in Zellzahl pro Milliliter			
Stamm	OD_{600nm}	entspricht [Zellen pro ml]	
<i>M. smegmatis</i> SMR5	1	$1,216 \cdot 10^8$	Empirisch durch KBE-Auszählung bestimmt
<i>M. fortuitum</i>	1	$0,76 \cdot 10^8$	Empirisch durch KBE-Auszählung bestimmt
<i>M. bovis</i> BCG	1	$0,76 \cdot 10^8$	Kalkuliert auf Basis der entsprechenden <i>hsp65</i> -Kopienzahl

Tabelle 9: Verwendete Umrechnungsfaktoren für die mykobakteriellen Kulturen: Umrechnung der optischen Dichte in Zellzahl pro Milliliter

Anschließend wurden die Zellen in Standard-Aktivitätstest-Puffer auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen pro ml eingestellt, um die für den Assay gewünschte Zelldichte zu erhalten.

Die Protein-Lösung bestand für jeden Ansatz aus dem Puffer 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl, 30 % Glycerin 1mM EDTA und 10 µM des zu testenden Proteins, was eine finale Molarität von 5 µM im Gesamtansatz ergab. Für die Experimente diente der Protein-Lagerungspuffer als Negativkontrolle und die Proteinmischung aus 50 µM Lysozym und 5 µM Lipase (*P. fluorescens*) als Positivkontrolle.

Für die anschließende Inkubation der Zellen mit den zu testenden Proteinen wurden alle Ansätze in sterilen *Ultra-Low-Attachment-Microtest-Platten* von Corning erstellt und inkubiert, wobei für jeden Ansatz je 150 µl Protein-Lösung und 150 µl Zell-Suspension verwendet wurden. Die Ansätze wurden nach dem Mischen für 20 h bei RT inkubiert und anschließend ausgewertet.

Für die Bestimmung der Reporter-gen-Kopienzahl mittels PMA basierter PCR-Inhibition wurde das BLU-V Viability PMA Kit von QIAGEN GmbH - Germany (Hilden) verwendet, wobei das Protokoll wie folgt angepasst wurde:

Die Ansätze wurden für 5 min bei 20000 g und bei 5 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Wells wurden dann mit 200 µl PBS nachgespült und die erhaltene Suspension wurden zu dem entsprechenden Pellet zugegeben. Anschließend wurde erneut für 5 min bei 20000 g und bei 5 °C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Pellets in 1 ml EB-Puffer resuspendiert und in je zwei 500 µl Fraktionen geteilt. In eine der beiden Fraktionen wurden dann 10 µl 2,5 mM PMA zugegeben und es wurde durch Vortexen gemischt. Nach dem Mischen wurden die Ansätze für 10 min im Dunkeln inkubiert und wurden dann für zwei mal 2,5 min auf Eis mit 650 W Halogenlicht bestrahlt, wobei das Reaktionsgefäß nach der ersten Bestrahlung axial um 180 ° gewendet wurde. Dann wurden die Zellen beider Fraktionen mit folgender Methode (abgewandelt von Käser M. *et al.*, 2009) lysiert.

Die Ansätze wurden für 5 min bei 13000 g zentrifugiert und es wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 300 µl 0,05 M Tris pH 8,5, 15 % Saccharose, 0,05 M EDTA resuspendiert und es wurde 50 µl 100 mg/ml Lysozym Lösung zugegeben. Die Ansätze wurden dann für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden 100 µl 20 % SDS zugegeben. Danach wurden 40 µl 2,5 mg/ml PK Lösung zugegeben und die Ansätze wurden erst für 1 h bei 56 °C und dann für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Zirkoniumdioxid/Siliziumdioxid-Beads (Ø 0,1 mm, Roth N033.1) zugegeben und die Ansätze wurden für 5 min bei 30 Hz in einem *Tissue-Lyser* behandelt. Die Ansätze wurden dann für 7 min bei 20000 g zentrifugiert und 300 µl des Überstandes wurden für die DNA-Isolation verwendet. Dafür wurde das QiaAMP Mini-Kit von QIAGEN GmbH - Germany (Hilden) verwendet und es wurde mit 100µl eluiert. Die erhaltenen DNA Lösungen der Ansätze wurden 1 : 10 verdünnt und wurden dann mit dem Terra™ qPCR Direct SYBR® Premix als Proben für die *hsp65* qPCR verwendet, wobei die *Primer* tb11 und tb12 (Telenti A. *et al.*, 1993) verwendet wurden. Dabei diente das in den Vektor pGEM®-T easy von Promega Corp. (Madison,

USA) insertierte tb11/tb12-Fragment des Mykobakterien-spezifischen *hsp65*-Gens als Standard zur absoluten Quantifizierung.

2.2.8.3. Quantifizierung der stoffwechselaktiven Zellen mittels Luziferase-basiertem ATP-

Nachweis

Die im Folgenden beschriebene Methode und die zugehörigen Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt. Die Ansätze wurden wie unter 2.2.8.2. *Bestimmung der Reporterengenmenge mittels PMA basierter PCR-Inhibition und qPCR* beschrieben erstellt.

Bei dieser Methode wird das zur Verfügung stehende ATP zusammen mit O₂ und Luciferin von dem Enzym Luziferase zu Adenosinmonophosphat, Pyrophosphat, CO₂ und Oxiluciferin umgesetzt. Dabei wird ein Photon abgegeben, welches für die Detektion des ATP-Umsatzes genutzt wird (Zourob M. *et al.*, 2008).

Für die Experimente wurde das BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay Kit verwendet. Dafür wurden nach sorgfältigem Mischen 100 µl der Ansätze abgenommen und mit 100 µl BacTiter-Glo™ Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die Lumineszenz-Intensität mit dem Luminometer Victor³ Multilabel Counter (PerkinElmer Inc.) bestimmt. Zur Bestimmung des ausschließlich intrazellulären ATP-Gehalts wurden die verbleibenden 200 µl der Ansätze für 5 min bei 20000 g pelletiert. Die erhaltenen Überstände wurden verworfen, die Pellets wurden in 100 µl PBS resuspendiert und mit 100 µl BacTiter-Glo™ Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die Lumineszenz-Intensität bestimmt.

2.2.8.4. Bestimmung der *minimal-inhibitory-concentration* (MIC):

Wachstumsinhibitionsnachweis mittels Resazurin-Reduktion

Die Bestimmung der MIC ist eine Standard-Methode der Mikrobiologie (Goldman E. and Green L. H., 2008). Für diese Arbeit wurde die folgende Abwandlung dieser Methode verwendet.

Um die nötige Zelldichte zu erreichen wurde als Vorkultur 10 bis 30 ml 7H9-Medium mit *M. smegmatis* SMR5 Zellen beimpft und 72 h bei 37 °C inkubiert. Die OD_{600nm} der Vorkultur wurde mit einem WPA Biowave CO8000 Photometer anhand einer 1 : 10 Verdünnung bestimmt. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation bei 3000 g für 45 min bei 4 °C in 50 ml Schraubröhrchen pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets durch dreimaliges Auf- und Ab-Pipettieren mit 10 ml serologischen Pipetten in 7H9-Medium auf eine OD_{600nm} von 0,6 resuspendiert, um die Zell-Suspension zu erhalten.

Die Protein-Lösung bestand für jeden Ansatz aus dem Puffer 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl, 30 % Glycerin 1mM EDTA und einer entsprechenden Molarität des zu testenden Proteins.

Für die anschließende Inkubation der Zellen mit den zu testenden Proteinen wurden alle Ansätze in *Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden, transp., steril* Platten erstellt und inkubiert, wobei für jeden Ansatz je 50 µl Protein-Lösung und 150 µl Zell-Suspension verwendet wurden. Zudem wurden die Kontrollen Mediumkontrolle und Wachstumskontrolle verwendet. Die Mediumkontrolle setzte sich aus 50 µl Lagerungspuffer und 150 µl 7H9-Medium ohne Zellen zusammen und diente der Bestimmung des Ansatz-Signales ohne Zellen. Die Wachstumskontrolle setzte sich aus 50 µl Lagerungspuffer und 150 µl Zelllösung zusammen, zur Bestimmung des Ansatz-Signales von unbehandelten, bzw. nur durch den Puffer beeinflussten Zellen. Zudem wurden die *Well* Reihen am äußeren Rand der Platte nicht für die Ansätze verwendet, sondern wurden mit 300 µl sterilem Wasser gefüllt, um während der Inkubation auftretende Verdunstungseffekte zu eliminieren.

Zuerst wurde die Protein-Lösung in den Wells vorgelegt und anschließend wurde die Zell-Suspension zugegeben. Dann wurde durch zweimaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und die Ansätze wurden für 20 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Ansätze für weitere 72 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die MIC mit Hilfe des Farbstoffes Resazurin bestimmt. Dabei wird die irreversible Reduktion von Resazurin durch die Reduktionsäquivalente der lebenden Zellen genutzt, wobei das fluoreszenzaktive Resorufin gebildet wird (Pesch K. L. and Simmert U., 1929; Taneja N. K. and Tyagi J. S., 2007). Die Zunahme des Resorufin-Fluoreszenzsignals korreliert mit der Zahl der lebenden Zellen.

Zur Messung wurden 20 µl 0,02 % Resazurin-Lösung zu jedem Ansatz zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Dann wurden die Platten für weitere 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensität des entstandenen Resorufins mit den in Tabelle 10 wiedergegebenen Parametern bestimmt.

Als MIC wurde die Konzentration gewertet, für die die Intensität maximal der Intensität der Mediumkontrolle + 20 % entsprach. Als „MIC-nah“ wurde die Konzentration gewertet, deren Intensität maximal der dreifachen Intensität der Mediumkontrolle entsprach.

Für die Untersuchung der Aktivitätssteigerung durch die Zugabe von Detergenzien wurden die von Grover N. *et al.* für Ms6gp3 und Bxz2gp12 etablierten Konzentrationen, also 0,05 % v/v Tween 80 bzw. 0,002 % v/v Triton X-100 für die Zugabe ausgewählt (Grover N. *et al.*, 2014), wobei in den Ansätzen durch das 7H9-Medium bereits 0,0375 % v/v Tween 80 vorlag. Daher wurde zu der Proteinlösung 0,2 % v/v Tween 80 (wodurch 0,0875 % v/v Tween 80 in den Ansätzen erhalten wurde) oder 0,008 % v/v Triton X-100 zugegeben (was eine Detergenzienzusammensetzung von 0,002 % v/v Triton X-100 und 0,0375 % v/v Tween 80 ergab).

Mischen der Ansätze	
Schütteln (Linear) Dauer:	5 s
Schütteln (Linear) Amplitude:	2,5 mm
Messung	
Modus	Fluoreszenz Messung von oben
Exzitationswellenlänge	560 nm
Emissionswellenlänge	590 nm
Exzitationsbandbreite	9 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Verstärkung	mit der Wachstumskontrolle bestimmt (60 - 75)
Anzahl der Blitze	25
Integrationszeit	20 μ s
Verzögerungszeit	0 μ s
Ruhezeit	0 ms
Z-Position (Manuell)	mit der Wachstumskontrolle bestimmt (20000 - 22000 μ M)

Tabelle 10: Parameter der Bestimmung der Resorufin-Fluoreszenzintensität

2.2.8.5. Wachstumsinhibitionsnachweis mittels BactecMGIT 960-System

Die im Folgenden beschriebene Methode und die zugehörigen Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt. Die Ansätze wurden wie unter 2.2.8.2. *Bestimmung der Reportergenmenge mittels PMA basierter PCR-Inhibition und qPCR* beschrieben erstellt.

Bei dem BactecMGIT 960 Wachstumsnachweis wird dem Kulturmedium (7 ml 7H9-Medium mit OADC-Supplement statt Tween 80) ein Fluoreszenzfarbstoff zugesetzt, der durch Sauerstoff gequencht wird. Durch das Zellwachstum wird die Sauerstoffsättigung des Mediums geringer und die Fluoreszenz des Farbstoffes wird detektiert, wobei der Zeitpunkt der ersten Fluoreszenzdetektion, die bei etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml erfolgt, als Ergebnis registriert wird (Williams-Bouyer N. *et al.*, 2000).

Für die Experimente wurden je 10 μ l von den Ansätzen abgenommen und 1 : 1000 für *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum* bzw. 1 : 100 für *M. bovis* BCG in 0,9 % NaCl verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 200 μ l in die kommerziellen BACTEC-MGIT-Kultur-Röhrchen von Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA) pipettiert und die Röhrchen wurden anschließend

bei 37 °C im BD BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacteria Culture System inkubiert. Die Wachstumsbeobachtung erfolgte vollautomatisch und wurde für jedes Experiment jeweils acht Wochen durchgeführt.

2.2.8.6. Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopische Beobachtung von bakteriellen Zellen ist eine Standard-Methode der Mikrobiologie (Goldman E. and Green L. H., 2008). Für diese Arbeit wurde die Phasenkontrast-Mikroskopie mit einem CX41 Mikroskop verwendet. Dabei wurde zum einen bei einer hundertfachen Vergrößerung der Zustand der Zellen anhand ihrer Morphologie beurteilt und zum anderen bei einer zwanzigfachen Vergrößerung die Zellzahl der Mykobakterienlösungen mit der Thoma CE 0,02mm Tiefe 0,0025mm² Zählkammer bestimmt.

2.2.8.7. BacLight-Vitalitäts-Zellfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Die im Folgenden beschriebene Methode und die zugehörigen Experimente wurden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt. Die Ansätze wurden wie unter 2.2.8.2. *Bestimmung der Reportergermenge mittels PMA basierter PCR-Inhibition und qPCR* beschrieben erstellt.

Für die Experimente wurden je 10 µl von den Ansätzen abgenommen und mit 10 µl 0,9 % Natriumchlorid gemischt. Dann wurden 2 µl BacLight-Farbstoff-Mischung zugegeben und die Proben wurden für 15 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben auf Objektträger gegeben und mit einem 40fach Objektiv und 1,3fachem digitalem Zoom in einem BZ-9000-Fluoreszenz-Mikroskop von Keyence Deutschland GmbH (Neu-Isenburg) mikroskopiert und dokumentiert.

2.2.8.8. Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM)

Für die Inkubation der Zellen mit den zu testenden Proteinen wurden alle Ansätze in sterilen 2,2 ml 96 Well Platten inkubiert, wobei für jeden Ansatz je 400 µl Protein-Lösung und 400 µl Zell-Suspension verwendet wurden.

Um die nötige Zelldichte zu erreichen, wurde als Vorkultur 50 ml 7H9-Medium mit *M. smegmatis* SMR5 Zellen beimpft und 72 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellzahl in der Vorkultur wurde mit der Thoma Zählkammer bestimmt, wobei eine 1 : 100 Verdünnung für die Zählung verwendet wurde, und die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 g für 45 min bei 4 °C in 50 ml Schraubröhrchen pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die

Zellpellets durch dreimaliges Auf- und Ab-Pipettieren mit 10 ml serologischen Pipetten in Standard-Aktivitätstest-Puffer auf eine Zellzahl von $1,4 \cdot 10^9$ Zellen pro ml resuspendiert.

Die Protein-Lösung bestand für jeden Ansatz aus dem Puffer 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl, 30 % Glycerin und es wurde eine End-Molarität von 5 μ M Protein im Gesamtansatz verwendet.

Für alle Ansätze wurde zuerst die Protein-Lösung in den Wells vorgelegt und anschließend die Zell-Suspension zugegeben. Es wurde durch fünfmaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und die Ansätze wurden dann für 4 h bei RT inkubiert. Danach wurde zu den Lysin B Vorinkubationsansätzen das Lysin A in der entsprechenden Menge zugegeben und alle Ansätze wurden erneut durch Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und für weitere 16 h bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurden alle Ansätze in einer 1 : 10 Verdünnung lichtmikroskopisch überprüft und die bestgeeigneten Ansätze als Proben für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie ausgewählt.

Die TEM-Proben wurden entsprechend des folgenden Protokolls von Prof. Reinhard Rachel aufbereitet und aufgenommen (Rachel R. *et al.*, 2010). 600 μ l der Probenlösung wurden abgenommen und durch Zugabe von 1,5 % (v/v) Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10000 g für 10 min pelletiert und wurden in circa 30 μ l des Überstands resuspendiert. Diese Lösung wurde auf Kohlenstoff-beschichtete Kupfer-Grids aufgetragen und für 30 s bei RT inkubiert. Danach wurden die Grids mit Filterpapier geblottet, einmal mit aufgereinigtem VE Wasser gewaschen und dann bei RT getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Grids mit Platin (Winkel 15 °, Elektronenstrahlverdampfung, CFE-50; Cressington, Watford, UK) bedampft und anschließend mit dem Transmissions-Elektronen-Mikroskop CM12 (120 keV) untersucht. Die Aufnahmen wurden digital mit einer CCD-Kamera erstellt (0124, TVIPS, Gauting).

3. Ergebnisse

3.1. Gentechnologische Arbeiten und Produktion der rekombinanten Proteine

3.1.1. Herstellung der Zielprotein-codierenden Expressionsvektoren

Für die Herstellung der Lysin-codierenden Expressionsvektoren wurde zunächst die Sequenz der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, L5gp10 und TM4gp29 und der Lysine B Bxz2gp12, D29gp12, L5gp12 und TM4gp30, per PCR aus synthetischen Genen (Invitrogen™ [Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG]) amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer und synthetischen Gene wurden so erstellt, dass die Lysin-Sequenz einen C-terminalen His-Tag enthielt und von den notwendigen Schnittstellen flankiert wurde. Das unter 2.2.2.1. aufgeführte Protokoll wurde für alle Lysine verwendet und nach Restriktionsverdau und Ligation wurden so die in Tabelle 11 dargestellten Lysin-codierenden Expressionsvektoren erzeugt. Basierend auf diesen Vektoren wurden außerdem für die Lysine A Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 Konstrukte mit einer Deletion der Zellwand-Bindedomäne (CBD) erzeugt. Dabei wurde durch *QuickChange* Mutagenese zum einen ein N-terminaler His-Tag in die Sequenz des jeweiligen Lysins eingebracht und zum anderen zwei *STOP Codons* vor dem Beginn der Sequenz der Zellwand-Bindedomänen inseriert.

Außerdem wurden die Artilysin-codierenden Expressionsvektoren durch *QuickChange* Mutagenese erzeugt. Die *Primer* wurden dabei so gewählt, dass zwischen der eingeführten Peptidsequenz und der Lysinsequenz eine Schnittstelle liegt, die das spätere Austauschen einzelner Komponenten erlaubt. Die somit erstellten und verwendeten Lysin- bzw. Artilysin-codierenden Expressionsvektoren sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben:

Konstrukt	Vektor	Schnittstellen
Bxz2gp11-His-Tag	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
His-Tag-Bxz2gp11	pET-21b Nt-His	His-Tag - NdeI - Protein - XhoI
His-Tag-Bxz2gp11ΔCBD	pET-21b noHis	NdeI - His-Tag-Protein - XhoI
Bxz2gp12-His-Tag	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
His-Tag-Bxz2gp12	pET-21b Nt-His	His-Tag - NdeI - Protein - XhoI
<i>Bxz2gp12-His-Tag-PK</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>PK-Bxz2gp12-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
D29gp10-His-Tag	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
His-Tag-D29gp10	pET-21b Nt-His	His-Tag - NdeI - Protein - XhoI
His-Tag-D29gp10ΔCBD	pET-21b noHis	NdeI - His-Tag-Protein - XhoI
D29gp12-His-Tag	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
His-Tag-D29gp12	pET-21b Nt-His	His-Tag - NdeI - Protein - XhoI
<i>D29gp12-His-Tag-LL-37</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>D29gp12-His-Tag-PK</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI

<i>Thioredoxin(TRX)-D29gp12-His-Tag-PK</i>	pET-32b noHis	START Codon - TRX - Enterokinase Schnittstelle - NcoI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>D29gp12-His-Tag-pK34</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>D29gp12-His-Tag-SMAP-29</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>Thioredoxin(TRX)-D29gp12-His-Tag-SMAP-29</i>	pET-32b noHis	START Codon - TRX - Enterokinase Schnittstelle - NcoI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>LL-37-D29gp12-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>LLKKK-18-D29gp12-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>pK34-D29gp12-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>PK-D29gp12-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>SMAP-29-D29gp12-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>L5gp10-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>L5gp12-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>His-Tag-L5gp12</i>	pET-21b Nt-His	His-Tag - NdeI - Protein - XhoI
<i>TM4gp29-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>His-Tag-TM4gp29</i>	pET-21b Nt-His	His-Tag - NdeI - Protein - XhoI
<i>His-Tag-TM4gp29ΔCBD</i>	pET-21b noHis	NdeI - His-Tag-Protein - XhoI
<i>TM4gp29-His-Tag-LL-37</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>TM4gp29-His-Tag-PK</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>TM4gp29-His-Tag-pK34</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>TM4gp29-His-Tag-SMAP-29</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag- AflII - Peptid - XhoI
<i>LL-37-TM4gp29-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>LLKKK-18-TM4gp29-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>pK34-TM4gp29-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>PK-TM4gp29-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>SMAP-29-TM4gp29-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Peptid - BamHI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>TM4gp30-His-Tag</i>	pET-21b noHis	NdeI - Protein-His-Tag - XhoI
<i>His-Tag-TM4gp30</i>	pET-21b Nt-His	His-Tag - NdeI - Protein - XhoI

Tabelle 11: Übersicht der Lysin-codierenden und Artilysin-codierenden Expressionsvektoren

Lysine A sind weiß hinterlegt, Lysine B grau hinterlegt und Artily sine *kursiv* dargestellt. ΔCBD zeigt die erzeugten Deletionsvarianten der Lysin A Proteine ohne Zellwand-Bindedomäne (CBD) und TRX- zeigt die N-terminale Fusion mit dem Protein Thioredoxin an. Die Vektoren pET-21b noHis, pET-21b Nt-His und pET-32b noHis sind unter 2.1.5. beschrieben. Die Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide und der verwendeten Proteine sind in Anhang 3 und Anhang 4 wiedergegeben.

3.1.2. Rekombinante Expression und affinitätschromatographische Reinigung der Proteine

Die entsprechenden Expressionsvektoren wurden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und die codierten Lysine bzw. Artily sine wurden, wie unter 2.2.3. beschrieben, exprimiert. Zur Aufreinigung des exprimierten Zielproteins wurde Affinitätschromatographie als Reinigungsverfahren genutzt. Exemplarisch ist im Folgenden das Ergebnis einer Reinigung von Lysin B D29gp12 mit C-terminalem His-Tag (D29gp12-H) gezeigt.

Wie in dem in Abbildung 7 dargestellten Chromatogramm erkennbar, ließ sich Protein an die Säule binden (2) und mit einem Imidazol-Gradienten wieder von der Säule eluieren (6).

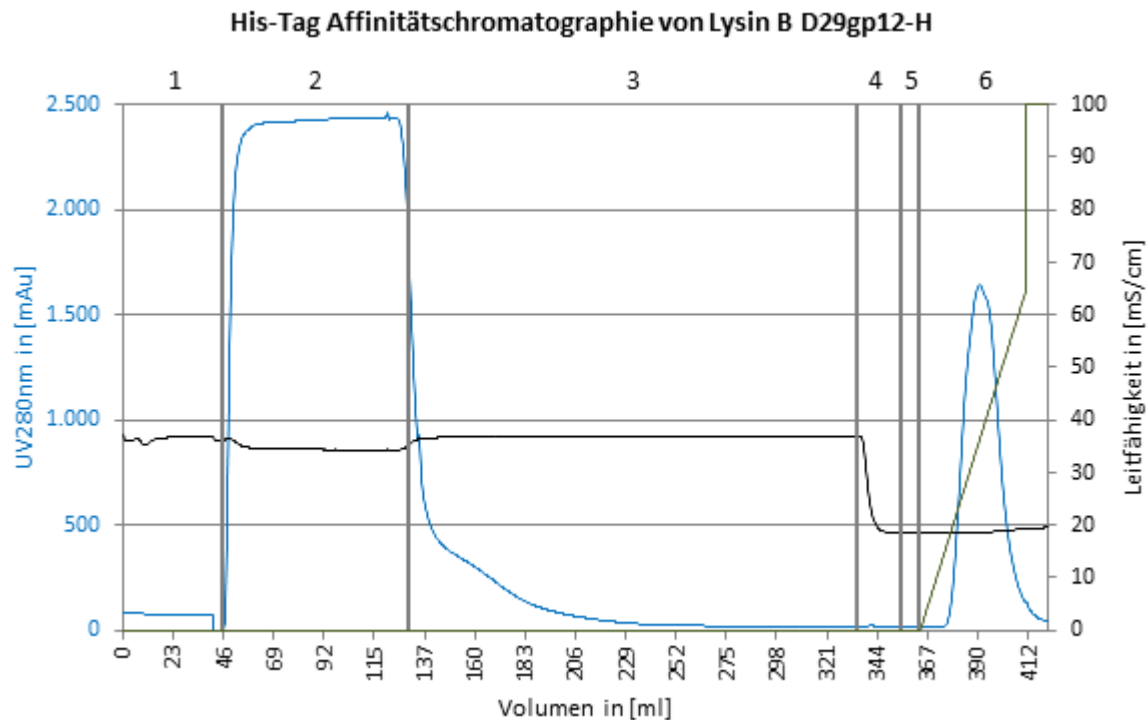


Abbildung 7: Chromatogramm der His-Tag Affinitätschromatographie von Lysin B D29gp12-H

Der erste Abschnitt ((1), bis 45 ml) zeigt die Äquilibration der HiTrap IMAC Sepharose FF Säule. Im zweiten Abschnitt ((2), 45 ml bis 130 ml) ist der Auftrag des geklärten Extraktes auf die Säule gezeigt. Dabei wurden die Proben „lösliche Fraktion“ und „Durchlauf“ erhalten. Der dritte (3), der vierte (4) und der fünfte Abschnitt (5) zeigen die Wasch-Phase mit dem Zellaufschlusspuffer, den Wechsel zu Waschpuffer und die Wasch-Phase mit diesem Puffer. Abschnitt (6) zeigt die Elution des gebundenen Proteins mittels eines Gradienten (Grün) von Waschpuffer zu Elutionspuffer (d.h. 0 mM zu 500 mM Imidazol) und es wurde die Probe „Eluat-Fraktion“ erhalten.

Für die anschließende Analyse der erhaltenen Fraktionen, d.h. die unlösliche Fraktion des Aufschlusses (P), die lösliche Fraktion des Aufschlusses (Crx), der Durchlauf des Säulenauftrags (DL) und die Eluat-Fraktion (E), wurde eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt.

Das gefärbte Gel zeigt dabei (siehe Abbildung 8 a) in der unlöslichen und der löslichen Fraktion eine starke Bande, die zwischen 25 kDa und 35 kDa liegt. Da D29gp12 mit His-Tag ein Molekulargewicht von 29,6 kDa aufweist, wurde es erfolgreich exprimiert. Zudem war die Intensität der Bande in der löslichen Fraktion höher als in der unlöslichen Fraktion, was dafür sprach, dass D29gp12-H mehrheitlich löslich exprimiert wurde. Auch im Durchlauf des Säulenauftrags wurde eine Bande bei dieser Höhe erhalten. Diese Beobachtung wurde auf nicht an die Säule gebundenes D29gp12-H zurückgeführt, was sich durch die Überschreitung der Säulenkapazität erklären lässt. Die Banden der Eluat-Fraktion zeigten, dass dort hauptsächlich D29gp12-H mit einer guten Reinheit von ca. 80 % vorlag.

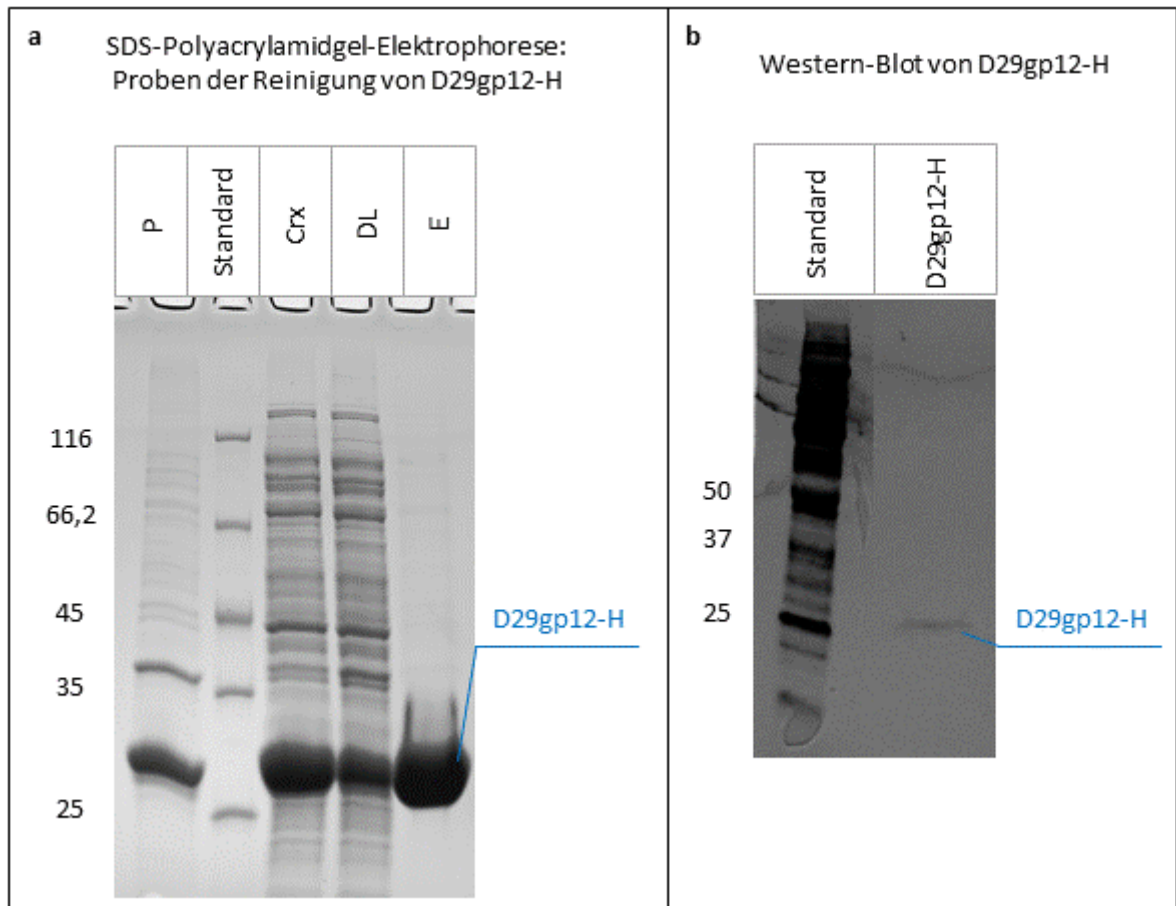


Abbildung 8: (a) SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der affinitätschromatographischen Reinigung des Lysin B D29gp12-H, (b) Western Blot einer 1 μ M Lösung von D29gp12-H

P bezeichnet die unlösliche Fraktion, Crx die lösliche, DL den Durchlauf, E die Eluat-Fraktion, D29gp12-H die aus der Eluat-Fraktion erstellte 1 μ M Lösung von D29gp12-H und Standard den Molekulargewichts-Standard. Die entsprechenden Molekulargewichte der Banden des Standards sind in kDa angegeben. Die Bande des rekombinant exprimierten Lysin B D29gp12-H ist mit einer blauen Markierung hervorgehoben.

Anschließend wurde ein Western Blot einer 1 μ M Lösung des Lysin B D29gp12-H mit einem Anti-His-Tag-Antikörper durchgeführt, um zu bestätigen, dass es sich bei dem eluierten Protein um das rekombinant hergestellte Protein handelt (siehe Abbildung 8 b). Die Bande von D29gp12-H war klar erkennbar und lag zwischen 25 kDa und 37 kDa. Somit wurde bestätigt, dass es sich bei dem eluierten Protein um D29gp12 mit His-Tag handelt.

Die abschließende Konzentrationsbestimmung der dialysierten D29gp12-H Lösung (siehe 2.2.5.1.) erlaubte dann die Bestimmung der Ausbeute, die hier bei 45,8 mg/l lag.

Für die weiteren Proteine mit einer Reinigungsausbeute von über 5 mg/l waren die Ergebnisse vergleichbar zu den für D29gp12-H gezeigten.

Bei Proteinen mit niedrigeren Expressionsausbeuten wurde ein deutlich höherer Anteil an unspezifisch gebundenen Proteinen in der Eluat-Fraktion und somit eine geringere Sauberkeit beobachtet. Um diesen Effekt abzuschwächen und ausreichende Proteinmengen für die Messungen zu erhalten, wurde für diese Proteine das Expressionsvolumen jeweils erhöht. Dennoch konnte, wie

in Abbildung 9 für Bxz2gp12-H erkennbar, die Sauberkeit, die die Proteine mit hohen Ausbeuten zeigten, nicht erreicht werden.

**SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese:
Proben der Reinigung von Bxz2gp12-H**

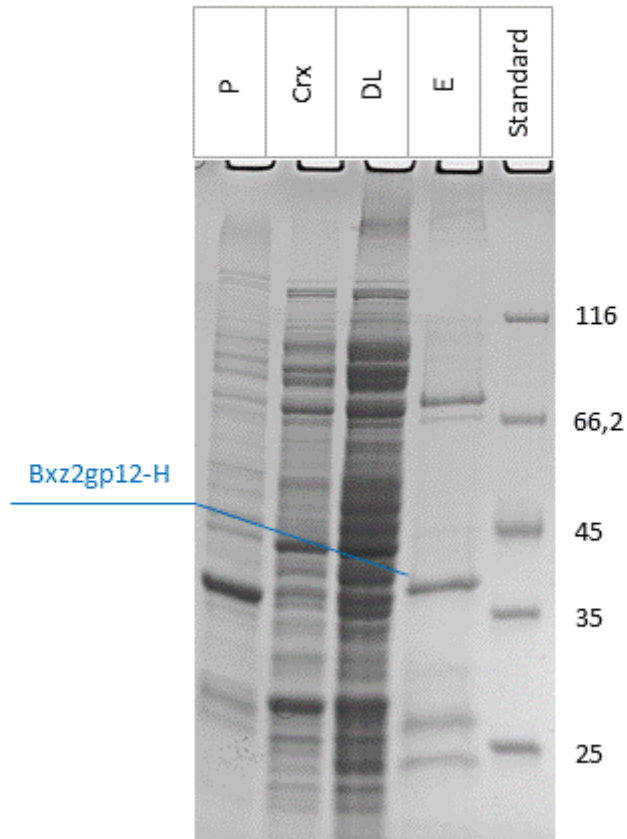


Abbildung 9: SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der affinitätschromatographischen Reinigung des Lysin B Bxz2gp12-H
Mit P ist die unlösliche Fraktion, mit Crx die lösliche, mit DL der Durchlauf, mit E die Eluat-Fraktion und mit Standard der Molekulargewichtsstandard bezeichnet. Die entsprechenden Molekulargewichte der Banden des Standards sind in kDa angegeben. Die Bande des rekombinant exprimierten Lysin B Bxz2gp12-H ist mit einer blauen Markierung hervorgehoben.

Die Ausbeute an löslichem Protein wurde für alle Proteine bestimmt und ist im Folgenden tabellarisch wiedergegeben:

Ausbeuten der rekombinant erzeugten Proteine nach der Affinitätschromatographie				
Protein	Ausbeute in [mg/l]	Geschätzter Anteil in der löslichen Fraktion in [%]	Bedingungen	
			Expression	Reinigung
Bxz2gp11-His-Tag	18,7	~ 70 %	ind. 0,25 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	(siehe 2.2.4.1.)

His-Tag-Bxz2gp11	37,8	~ 30 %	ind. 0,5 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	50 mM TRIS (HCl) pH 8,2 statt 20mM HEPES (NaOH) pH 7,4 und 5 % statt 30 % Glycerin
His-Tag-Bxz2gp11ΔCBD	63,0	~ 90 %	ind. 0,25 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	(siehe 2.2.4.1.)
Bxz2gp12-His-Tag	0,4	~ 10 %		0 mM Imidazol im Aufschlusspuffer statt 20 mM Imidazol und pH 8 statt pH 7,4
His-Tag-Bxz2gp12	2,1	~ 50 %	ind. 0,5 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	Es wurde kein Glycerin verwendet und der Aufschlusspuffer enthielt 1000 mM NaCl statt 500 mM NaCl und es wurde kein Waschpuffer- Schritt durchgeführt
Bxz2gp12-His-Tag-PK	0,5	< 10 %	ind. 0,25 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	0 mM Imidazol im Aufschlusspuffer statt 20 mM Imidazol und pH 8 statt pH 7,4
PK-Bxz2gp12-His-Tag	0,8	nicht bestimmbar		
D29gp10-His-Tag	18,0	~ 40 %		(siehe 2.2.4.1.)
His-Tag-D29gp10	9,6	~ 20 %	ind. 0,5 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	50 mM TRIS (HCl) pH 8,2 statt 20mM HEPES (NaOH) pH 7,4 und 5 % statt 30 % Glycerin
His-Tag-D29gp10ΔCBD	5,1	~ 40 %	ind. 0,25 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	(siehe 2.2.4.1.)
D29gp12-His-Tag	45,8	~ 80 %		
His-Tag-D29gp12	19,7	~ 30 %		
<i>D29gp12-His-Tag-LL-37</i>	0,4	nicht bestimmbar		
<i>D29gp12-His-Tag-PK</i>	1,9	< 10 %		
<i>TRX-D29gp12-His-Tag-PK</i>	11,6	~ 30 %		
<i>D29gp12-His-Tag-pK34</i>	10,1	~ 10 %		
<i>D29gp12-His-Tag-SMAP-29</i>	0,1	nicht bestimmbar		

<i>TRX-D29gp12-His-Tag-SMAP-29</i>	0,0	nicht bestimmbar	ind. 0,25 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	(siehe 2.2.4.1.)
<i>LL-37-D29gp12-His-Tag</i>	0,1	< 10 %		
<i>pK34-D29gp12-His-Tag</i>	8,5	~ 20 %		
<i>PK-D29gp12-His-Tag</i>	4,1	~ 30 %		
<i>SMAP-29-D29gp12-His-Tag</i>	0,0	nicht bestimmbar		
L5gp10-His-Tag	0,2	~ 20 %	ind. 1 mM IPTG, Expression für 4 h bei 37 °C	Es wurde kein Glycerin verwendet und der Aufschlusspuffer enthielt 1000 mM NaCl statt 500 mM NaCl und es wurde kein Waschpuffer- Schritt durchgeführt
L5gp12-His-Tag	0,6	~ 50 %		
His-Tag-L5gp12	0,2	< 10 %	ind. 0,5 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	
TM4gp29-His-Tag	8,7	~ 50 %	ind. 0,25 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	(siehe 2.2.4.1.)
His-Tag-TM4gp29	13,3	~ 70 %		
His-Tag-TM4gp29ΔCBD	10,4	~ 50 %		
<i>TM4gp29-His-Tag-LL-37</i>	0,0	< 10 %		
<i>TM4gp29-His-Tag-PK</i>	5,9	~ 80 %		
<i>TM4gp29-His-Tag-pK34</i>	1,4	~ 60 %		
<i>TM4gp29-His-Tag-SMAP-29</i>	0,0	nicht bestimmbar		
<i>LL-37-TM4gp29-His-Tag</i>	0,2	< 10 %		

<i>LLKKK-18-TM4gp29-His-Tag</i>	0,2	< 10 %	ind. 0,25 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	(siehe 2.2.4.1.)
<i>pK34-TM4gp29-His-Tag</i>	13,7	~ 70 %		
<i>PK-TM4gp29-His-Tag</i>	5,9	~ 50 %		
<i>SMAP-29-TM4gp29-His-Tag</i>	0,2	< 10 %		
TM4gp30-His-Tag	0,3	< 10 %	ind. 1 mM IPTG, Expression für 4 h bei 37 °C	Es wurde kein Glycerin verwendet und der Aufschlusspuffer enthielt 1000 mM NaCl statt 500 mM NaCl und es wurde kein Waschpuffer- Schritt durchgeführt
His-Tag-TM4gp30	0,4	~ 20 %	ind. 0,5 mM IPTG, Expression üN bei 16 °C	

Tabelle 12: Ausbeuten nach affinitätschromatographischer Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine

Induziert wurde mit ind. abgekürzt. Lysine A sind weiß hinterlegt, Lysine B sind grau hinterlegt, Artilylinsine sind *kursiv* dargestellt. Δ CBD zeigt die erzeugten Deletionsvarianten der Lysine A ohne Zellwand-Bindedomäne (CBD) und TRX- die N-terminale Fusion mit Thioredoxin zur Löslichkeitsverbesserung an.

Für die weiteren Experimente sollten mindestens zwei Lysin A und zwei Lysin B Kandidaten ausgewählt werden. Hierbei war die Ausbeute an löslichem Protein ein entscheidendes Kriterium.

Der Vergleich zwischen den Lysinen A zeigte, dass Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 gute Ausbeuten aufweisen, wohingegen L5gp10 nur geringe Ausbeuten liefert. Deswegen wurden Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 als Lysin A Kandidaten ausgewählt und auch Varianten dieser Proteine ohne CBD hergestellt. Die Deletion der CBD zeigte allerdings einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf die lösliche Expression. Für Bxz2gp11 Δ CBD stieg die Ausbeute um circa Faktor 3 und auch der geschätzte Anteil an löslichem Protein nahm zu, was den Schluss nahelegte, dass die Deletion zu einer Verbesserung der Löslichkeit führte. Bei TM4gp29 Δ CBD verändert sich die Ausbeute nur unwesentlich. Die Expression von D29gp10 Δ CBD ergab jedoch eine um circa Faktor 3 reduzierte Ausbeute, die mit einer stärkeren Lyse der *E. coli* BL21 (DE3) Expressionszellen einherging. Da der geschätzte Anteil an löslichem Protein vergleichbar war, wurde vermutet, dass die geringere Ausbeute durch die höhere Toxizität (Lyse) von D29gp10 Δ CBD für die Expressionszellen entstand.

Bei den Lysinen B zeigte hingegen nur D29gp12 eine gute Ausbeute. Da die anderen Lysine B Bxz2gp12, Lgp12 und TM4gp30 vergleichbare Ausbeuten aufwiesen, wurde der zweite Lysin B Kandidat basierend auf der *in vitro* Aktivität (siehe 3.3.1.) ausgewählt, wobei Bxz2gp12 den höchsten Substratumsatz zeigte.

Briers Y. *et al.*, 2014b beobachteten für die untersuchten Artilylinsine bei mehreren Konstrukten, dass die Fusion des Endolysins mit dem Peptid einen negativen Einfluss auf die Ausbeute haben kann

(Briers Y. *et al.*, 2014b). Dieser Effekt zeigte sich auch für die in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine, die aus dem Lysin A TM4gp29 oder dem Lysin B D29gp12 und den Peptiden LL-37, SMAP-29 oder LLKKK-18 bestanden. Dabei fiel die Ausbeute für diese Artlysine um circa Faktor 90 auf unter 0,5 mg/l und auch der lösliche Anteil war stark reduziert. Außerdem wies die Fusion mit dem Löslichkeits-Tag Thioredoxin für das Konstrukt *TRX-D29gp12-His-Tag-SMAP-29* im Gegensatz zu der Variante mit dem PK Peptid keine Verbesserung der Gesamtausbeute und des löslichen Anteils auf. Daher wurde vermutet, dass die Reduktion der Ausbeute bei der Fusion mit dem SMAP-29 Peptid nicht auf einer verringerten Löslichkeit, sondern auf einer höheren Toxizität für die Expressionszellen basierte. Auch für die weiteren auf Lysin B D29gp12 basierenden Artlysine, d.h. der Fusion mit dem PK Peptid oder dem pK34 Peptid, wurde eine starke Reduktion der Ausbeute und des löslichen Anteils beobachtet. Insgesamt war die Reduktion aber geringer als für die anderen Peptide. Bei dem PK Peptid war die Ausbeute dabei um circa Faktor 24 für die C-terminale und circa Faktor 11 für die N-terminale Fusion reduziert. Konstrukte mit dem pK34 Peptid zeigten bei beiden Varianten eine Reduktion der Ausbeute um circa Faktor 5. Auch die Fusion des Lysins A TM4gp29 mit dem PK Peptid zeigte eine geringfügige Reduktion der Ausbeute um circa Faktor 1,4. Für die Fusion mit dem pK34 Peptid hingegen zeigte das Konstrukt mit der N-terminalen Fusion eine um circa Faktor 0,6 verbesserte Ausbeute, während die Modifikation des C-Terminus die Ausbeute um circa Faktor 6 senkte, wobei der lösliche Anteil der beiden Konstrukte vergleichbar war. Daher wurde aus den Beobachtungen gefolgert, dass der Effekt der reduzierten Ausbeute durch mehrere Faktoren, wie z.B. die reduzierte Löslichkeit und Expression oder die höhere Toxizität entsteht.

3.2. Biophysikalische Charakterisierung ausgewählter Lysine

3.2.1. Nah-UV-Spektroskopie

Für die erste Charakterisierung der gereinigten Proteine wurden Absorptions-Spektren von 240 nm bis 340 nm gemessen. Wie in Abbildung 10 exemplarisch dargestellt, wiesen die Proteinspektren ein Minimum bei circa 250 nm, ein Maximum bei circa 280 nm, eine Tryptophan-bedingte Schulter bei circa 290 nm und fast keine Absorption bei 330 nm auf.

Wie unter 2.2.5.1. beschrieben wurde das gemessene Absorptionsmaximum bei 280 nm zur Bestimmung der Proteinkonzentration bzw. der Proteinmolarität genutzt. Dabei erlaubte die zusätzliche Betrachtung des Verhältnisses der Abs_{250nm} mit der Abs_{280nm} eine Beurteilung der in diesem Bereich absorbierenden Kontaminanten wie z.B. DNA, wobei das Verhältnis in der Regel kleiner als 0,7 war, was eine gute Reinheit der Proteinlösungen anzeigte. Eine mögliche Proteinaggregation wurde anhand der Abs_{330nm} beurteilt. Dafür wurde ein Anstieg des Absorptionssignals bei 330 nm als eine Zunahme der lichtstreuenden Proteinaggregate betrachtet.

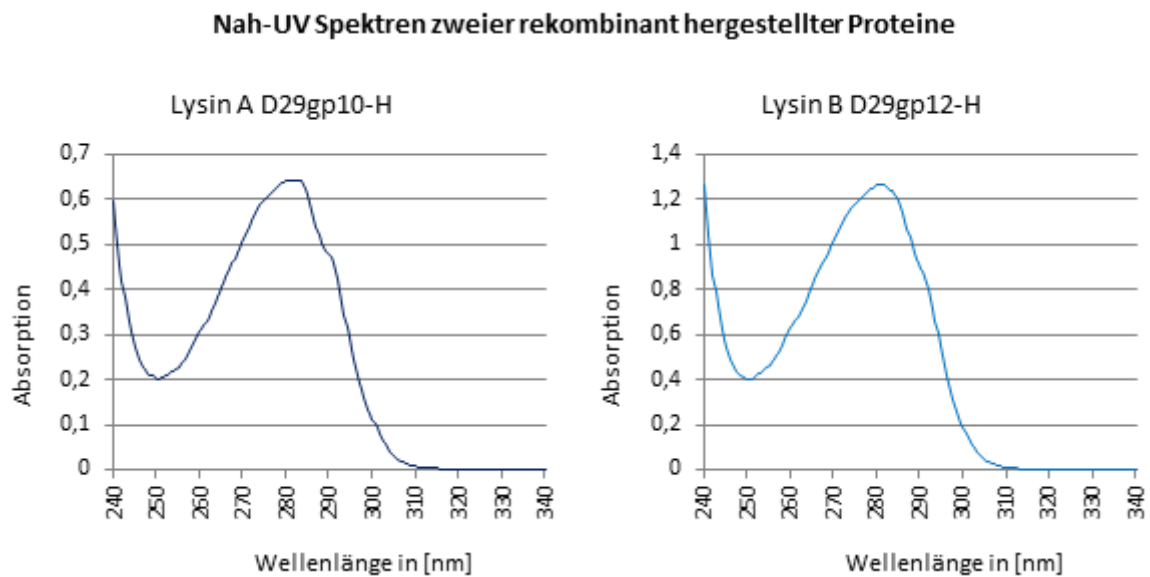


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Nah-UV Spektren der Proteine D29gp10-H (links) und D29gp12-H (rechts)

Auf diese Weise konnten Proteinlösungen mit einem geringen Anteil an Proteinkontaminationen vermessen werden. Dieser Ansatz war bei Lösungen mit niedriger Sauberkeit nicht direkt verwendbar. Um dennoch eine genäherte Proteinkonzentration zu erhalten, wurde die Intensität der Bande des Zielproteins mit den Banden der unspezifisch gebundenen Proteine verglichen, um den Anteil des Zielproteins abzuschätzen. Diese Schätzung wurde dann als Korrekturfaktor in die Berechnung der Konzentration eingeführt, wobei dadurch ein schätzungsbedingter Fehler entstand.

3.2.2. CD-Spektroskopie

Um die Lysin Kandidaten und die CBD Deletionsvarianten der Lysin A Kandidaten weiter zu charakterisieren, wurden CD Spektren im Fern-UV-Bereich von 195 nm bis 260 nm aufgenommen, um die Sekundärstrukturen der Proteine zu beurteilen.

Die gemessenen Spektren der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29, der Lysine B Bxz2gp12 und D29gp12 (siehe Abbildung 11) zeigten dabei eine Zusammensetzung aus α -helikalen- und β -Faltblatt-Anteilen. Daraus wurde geschlossen, dass die rekombinant hergestellten Proteine stabile Sekundärstrukturen ausgebildet hatten, was als Indikator für eine korrekte Faltung gilt. Die Lysin A Deletionsvarianten Bxz2gp11 Δ CBD, D29gp10 Δ CBD und TM4gp29 Δ CBD zeigten ebenfalls Spektren, die eine Mischung aus α -Helix und β -Faltblatt darstellten. Diese Beobachtung belegte, dass die Deletion der CBD nicht zu einem Verlust der Sekundärstrukturen der enzymatisch aktiven Domänen (EAD) führte.

CD-Spektren der Lysine A, der CBD-Deletionsvarianten und der Lysine B

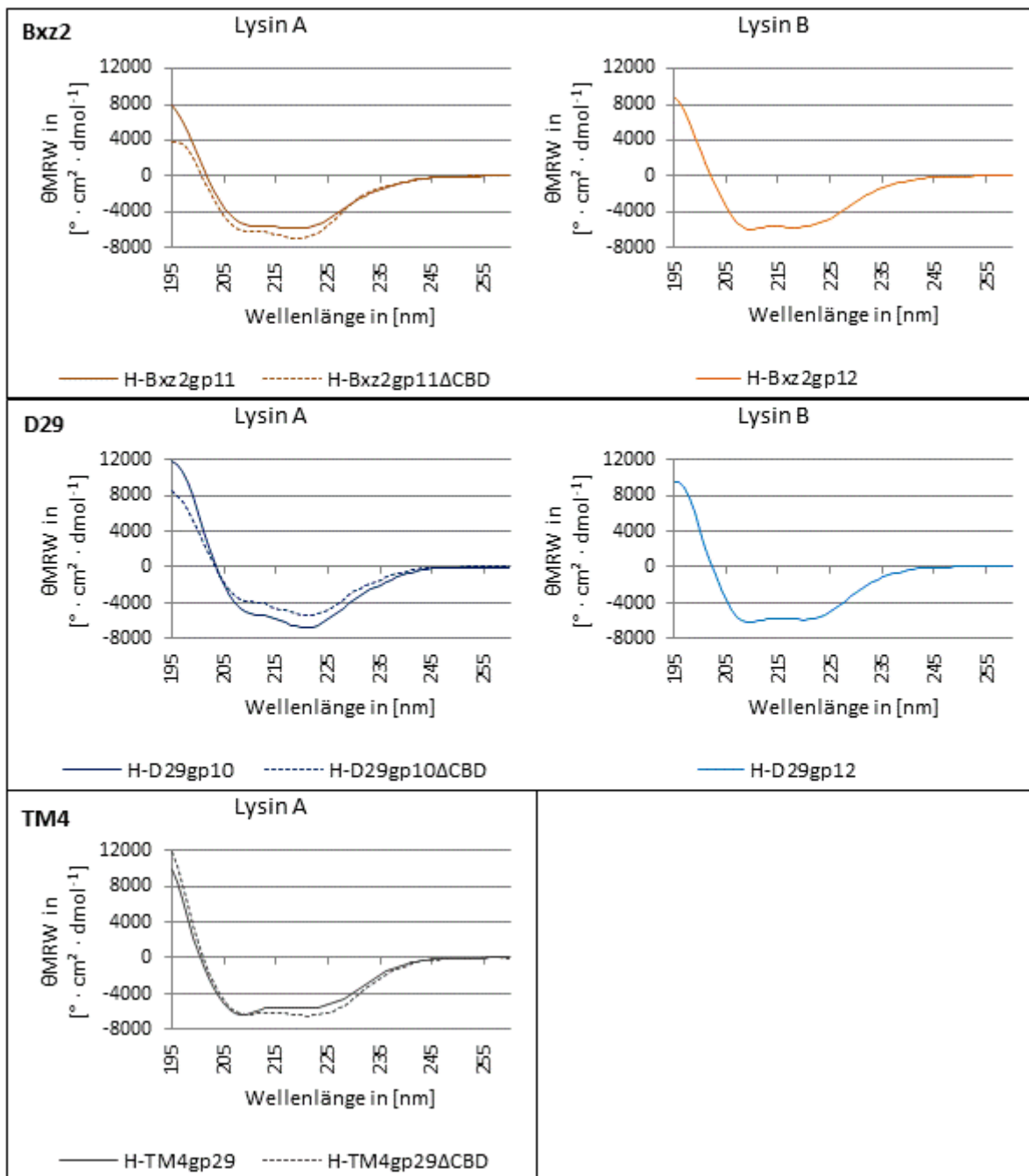


Abbildung 11: CD-Spektren der Lysine A, der Lysin A Varianten ohne CBD und der Lysine B

Die Θ_{obs} -Spektren wurden mit 10 μM Lysin in dem CD-Spektroskopie-Puffer 2 bei RT gemessen und anschließend die dargestellten Θ_{MRW} -Spektren mit der unter 2.2.5.2. angegebenen Formel erstellt.

3.2.3. Analytische Gelfiltrationschromatographie

Zur Charakterisierung des Oligomerisierungszustandes von Lysin A und Lysin B, sowie einer möglichen Interaktion zwischen Lysin A und Lysin B wurde analytische Gelfiltrationschromatographie angewendet. Dabei wurden nur Lysine und CBD Deletionsvarianten eingesetzt, die eine ausreichende

Reinheit aufwiesen. Zudem wurden reduzierende Bedingungen gewählt, um eine Oligomerisierung durch die Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken (Cystine) auszuschließen, sowie ein Laufpuffer mit 150 mM Natriumchlorid verwendet, um physiologische Bedingungen zu erhalten. In Vorversuchen wurde beobachtet, dass bei dieser Ionenstärke die Aggregation der Proteine bei niedrigeren Molaritäten als im Lagerpuffer eintrat. Um diese Problematik zu vermeiden wurde daher eine Molarität von 5 μ M für alle eingesetzten Proteine verwendet.

Das in Abbildung 12 a gezeigte Chromatogramm des Lysin A Bxz2gp11 (MW 58,8 kDa) zeigte drei *Peaks*. Der erste *Peak* lag mit 8,7 ml Retentionsvolumen (1) im Ausschlussvolumen, was auf große Proteinaggregate hinwies. Die anderen *Peaks* eluierten im Trennbereich der Säule, wobei der *Peak* mit der höheren Intensität bei einem Retentionsvolumen von 12,7 ml (2) und der andere bei einem Retentionsvolumen von 16,5 ml (3) eluierte. Dies entsprach den Molekulargewichten von 187 kDa und 30 kDa und zeigte, dass Bxz2gp11 mehrheitlich als Oligomer vorlag. Das Chromatogramm der CBD Deletionsvariante Bxz2gp11 Δ CBD (MW 46,4 kDa) wies hingegen nur einen *Peak* bei 15,8 ml (4) auf, der einem Molekulargewicht von 42 kDa entsprach. Diese Masse deutete auf einen monomeren Zustand für die CBD Deletionsvariante hin, was vermuten lässt, dass die Oligomerisierung von Bxz2gp11 durch die Zellwand-Bindedomäne vermittelt wird.

Die in Abbildung 12 b dargestellten Chromatogramme von Lysin A D29gp10 (55,9 kDa) und der Deletionsvariante D29gp10 Δ CBD (44,4 kDa) zeigten jeweils einen *Peak* der eine Schulter bei höherem Retentionsvolumen aufwies. Dabei entsprach bei D29gp10 der *Peak* einem Molekulargewicht von 118 kDa (1) und die Schulter einem Molekulargewicht von 37 kDa (2), was zeigte, dass das Lysin hauptsächlich als Oligomer vorlag. Der *Peak* und die Schulter von D29gp10 Δ CBD hingegen ergaben die Molekulargewichte von 27 kDa (3) und 12 kDa (4), was einen monomeren Zustand für die Deletionsvariante ergab. Damit wurde auch für D29gp10 eine durch die Zellwandbindedomäne vermittelte Oligomerisierung beobachtet.

Das Chromatogramm des Lysins A TM4gp29 (59,6 kDa) wies wie in der Abbildung 12 c gezeigt, zwei *Peaks* auf. Der erste *Peak* lag im Ausschlussvolumen (1), was auf große Proteinaggregate hinwies. Der zweite *Peak* lag im Trennbereich bei einem Retentionsvolumen von 12,0 ml (2), was einem Molekulargewicht von 264 kDa und damit einen Oligomer entsprach. Die Deletionsvariante TM4gp29 Δ CBD (44,2 kDa) zeigte hingegen nur einen *Peak* und dieser ergab ein Molekulargewicht von 29 kDa (3), was einem Monomer entsprach. Auch für TM4gp29 wurde die Oligomerisierung also durch die CBD vermittelt.

Analytische Gelfiltrationschromatographie: Lysine A und CBD Deletionsvarianten

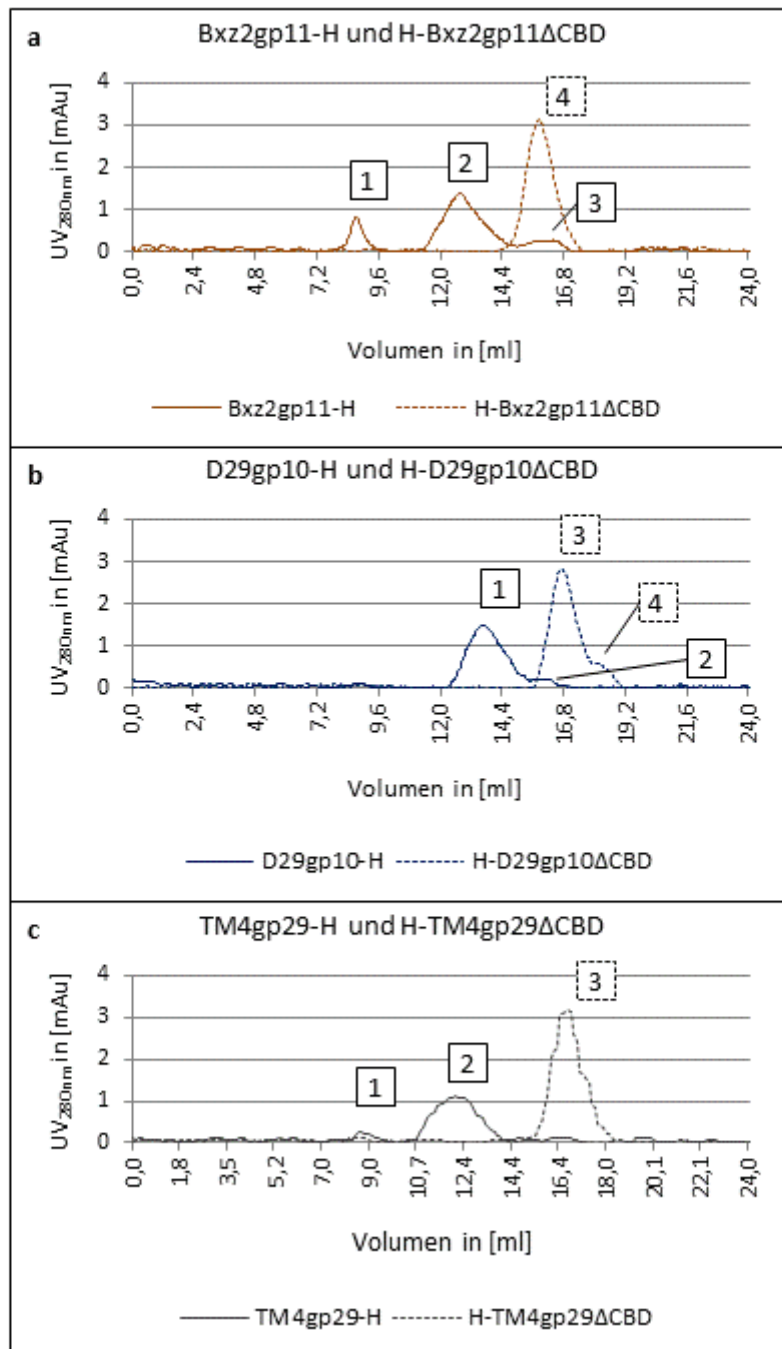


Abbildung 12: Überlagerung der analytischen Gelfiltrationschromatographie-Läufe der Lysine A und der CBD Deletionsvarianten; (a) Bxz2gp11-H und H-Bxz2gp11ΔCBD, (b) D29gp10-H und H-D29gp10ΔCBD und (c) TM4gp29-H und H-TM4gp29ΔCBD

Mit ΔCBD ist die Lysin A Variante mit der Deletion der Zellwand-Bindedomäne angezeigt. Die erhaltenen *Peaks* sind in den Spektren mit Nummern markiert. Die Messungen wurden wie unter 2.2.5.3. beschrieben durchgeführt. Die Retentionszeiten der erhaltenen *Peaks* wurden mit der Unicorn Software bestimmt und für die weitere Bearbeitung exportiert. Aus den Retentionszeiten wurde mit der aus der Kalibrierungsgerade erhaltenen Formel das entsprechende Molekulargewicht berechnet.

Da Lysin A und Lysin B in der lytischen Kasette der Mykobakteriophagen codiert sind und vermutlich gleichzeitig exprimiert werden, wurde auch eine mögliche Interaktion von Lysin A und Lysin B untersucht. Dazu wurden Lysin A und Lysin B aus dem Mykobakteriophagen D29 verwendet. Zur Darstellung wurde das Chromatogramm der 1 : 1 Mischung aus D29gp10 und D29gp12 mit den Chromatogrammen der Einzelproteine überlagert und verglichen (siehe Abbildung 13).

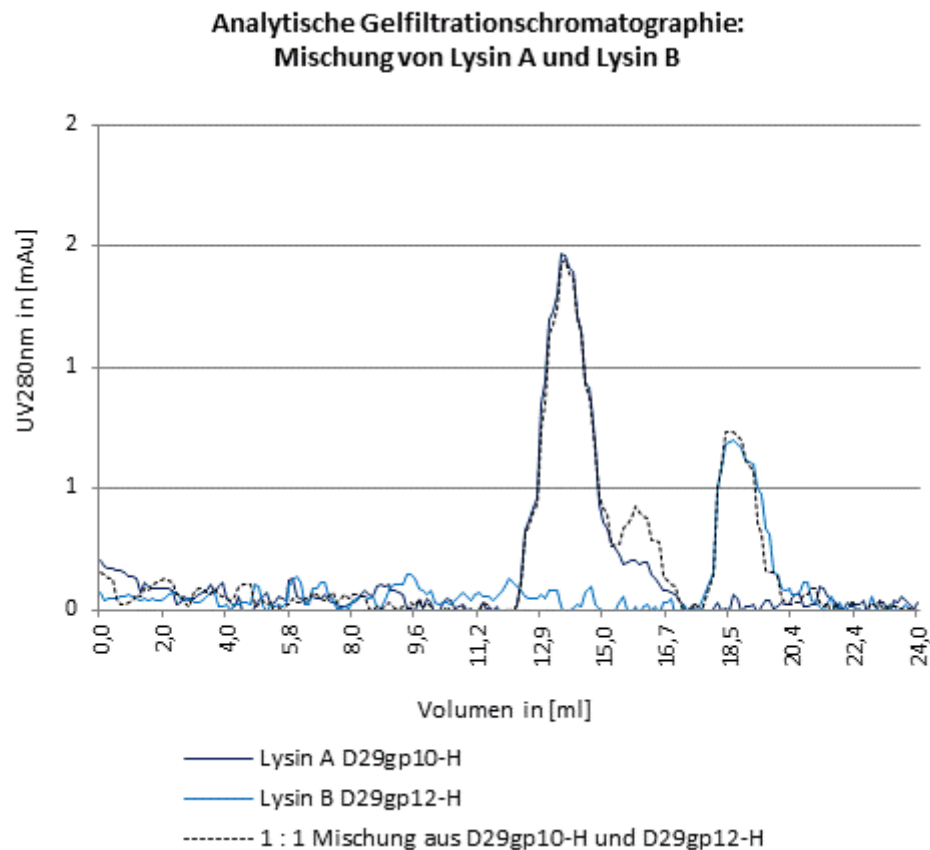


Abbildung 13: Überlagerung der analytischen Gelfiltrationschromatographie-Läufe der Proteine D29gp10-H, D29gp12-H und der Mischung von D29gp10-H und D29gp12-H

Die Messungen wurden wie unter 2.2.5.3. beschrieben durchgeführt. Die Retentionszeiten der erhaltenen *Peaks* wurden mit der Unicorn Software bestimmt und für die weitere Bearbeitung exportiert. Aus den Retentionszeiten wurde mit der aus der Kalibrierungsgerade erhaltenen Formel das entsprechende Molekulargewicht berechnet.

Der Vergleich zwischen der Mischung und den Einzelproteinen zeigte dabei deutlich, dass der Haupt-*Peak* des Lysin A D29gp10 und der *Peak* des Lysin B D29gp12 bei den Chromatogrammen deckungsgleich ist. Die Schulter des D29gp10 *Peaks* hingegen war in dem Chromatogramm der Mischung etwas höher, lag aber bei demselben Retentionsvolumen. Damit lag also keine Veränderung des Molekulargewichts, sondern nur eine höhere Intensität der Schulter vor. Da zudem keine neu entstandenen *Peaks* in dem Chromatogramm der Mischung erkennbar waren, wurde gefolgert, dass unter diesen Bedingungen keine Interaktion zwischen Lysin A und Lysin B vorliegt.

3.2.4. Optimierung der Reinigungs- und Lagerungspuffer

3.2.4.1. FTSA Experimente zur Optimierung des Puffersystems und zur Überprüfung des Einflusses verschiedener Natriumchlorid-Konzentrationen

Wie die Daten der Proteinreinigungen zeigten (siehe 3.1.2.), war ein großer Anteil der Lysine in der unlöslichen Fraktion. Um zu überprüfen, ob der lösliche Anteil durch eine Änderung des Puffersystems verbessert werden kann, wurden daher FTSA Experimente mit den Lysin A Kandidaten Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 und dem Lysin B Kandidaten D29gp12 durchgeführt. Dabei war, wie in der Tabelle 13 dargestellt, das anfangs verwendete Puffersystem TRIS pH 8,2 nur für D29gp10 ideal. Für die anderen Lysine wurde durch eine Änderung des Puffersystems zu HEPES (NaOH) pH 7,4 eine Verbesserung des Schmelzpunktes erreicht, wobei der Schmelzpunkt von D29gp10 unverändert blieb. Daher wurde das Puffersystem TRIS durch HEPES (NaOH) pH 7,4 ersetzt.

Optimierung des Puffersystems				
		gemessene Schmelztemperatur		
		Start-Puffer: TRIS pH 8,2	optimierter Puffer: HEPES pH 7,4	Differenz
Lysin A	Bxz2gp11	53 °C	55 °C	+2 °C
	D29gp10	49 °C	49 °C	0 °C
	TM4gp29	47 °C	53 °C	+6 °C
Lysin B	D29gp12	52 °C	54 °C	+2 °C

Tabelle 13: Ausgewählte Schmelzpunkte der FTSA Experimente zur Optimierung des Puffersystems

Es wurde je 0,1 mg/ml Protein verwendet.

In der Folge wurde die Abhängigkeit des Schmelzpunktes von der Natriumchloridmolarität in dem Bereich von 0 mM bis 500 mM überprüft, da in den Vorversuchen zur analytischen Gelfiltration (siehe 3.2.3.) bei 150 mM NaCl Aggregation bei niedrigeren Proteinkonzentrationen beobachtet worden war.

Bestimmung des Einflusses der Natriumchlorid-Molarität							
		NaCl Molarität					
		0 mM	100 mM	200 mM	300 mM	400 mM	500 mM
Lysin A	Bxz2gp11	53 °C	54 °C	53 °C	53 °C	54 °C	53 °C
	D29gp10	n.b.					
	TM4gp29	52 °C	52 °C	52 °C	53 °C	53 °C	56 °C
Lysin B	D29gp12	54 °C	55 °C	55 °C	54 °C	54 °C	55 °C

Tabelle 14: Schmelzpunkte aus dem FTSA Experimenten zur Bestimmung des Einflusses der Natriumchloridmolarität auf die thermische Stabilität der ausgewählten Lysine

Es wurde je 0,1 mg/ml Protein verwendet. n.b.: der Schmelzpunkt konnte aus der erhaltenen Kurve nicht ermittelt werden.

Die erhaltenen Schmelzpunkte (siehe Tabelle 14) zeigten für die Lysine Bxz2gp11 und D29gp12 keine Abhängigkeit der thermischen Stabilität von der Natriumchloridmolarität. TM4gp29 wies eine klare Zunahme des Schmelzpunktes bei 500 mM NaCl und einen generellen Trend zu einer Erhöhung des

Schmelzpunktes mit zunehmender Natriumchloridmolarität auf. Für D29gp10 konnte keine Erkenntnis aus den Daten gewonnen werden, da die erhaltenen Kurven keine klare Schmelzpunktermittlung zuließen.

Die Ergebnisse zeigten damit, dass 500 mM Natriumchlorid für TM4gp29 vorteilhaft ist, für die anderen Lysine aber weder einen positiven noch einen negativen Effekt zeigt. Deswegen wurde diese Molarität für die Puffer verwendet.

3.2.4.2. Optimierung des Lagerungspuffers mittels Lysin B *in vitro* Restaktivitätsuntersuchungen

Trotz der Optimierung des verwendeten Puffersystems wurde bei der Lagerung bereits nach 21 Tagen eine starke Abnahme der *in vitro* Aktivität des Lysin B Bxz2gp12 beobachtet. Auch D29gp12 zeigte eine lagerungsbedingte Abnahme, die jedoch geringer ausfiel. Deswegen wurde ein Lagerungsexperiment durchgeführt, bei dem die Abnahme der *in vitro* Aktivität der Lysin B Kandidaten in den verschiedenen Puffern für 55 Tage bestimmt wurde. Dabei zeigte der Ausgangs-Puffer 20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl für Bxz2gp12 und D29gp12 bereits nach 21 Tagen Lagerung eine Abnahme auf circa 26 % bzw. auf circa 59 % der *in vitro* Aktivität und nach 55 Tagen war die Restaktivität auf circa 12 % bzw. circa 53 % gefallen (siehe Tabelle 15).

Einfluss von Puffer und Temperatur auf den Aktivitätsverlust bei Lagerung für 21 bzw. 55 Tage					
Puffer	Temperatur	<i>in vitro</i> Restaktivität in [% des maximalen Umsatzes]			
		Bxz2gp12-H		D29gp12-H	
		nach 21 Tagen	nach 55 Tagen	nach 21 Tagen	nach 55 Tagen
20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl 30 % Glycerin	Lagerung bei: -20 °C	94 ± 14	55 ± 14	100 ± 16	21 ± 42
20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4, 500 mM NaCl 30 % Glycerin	Lagerung bei: 4 °C bis 8 °C	100 ± 14	56 ± 15	86 ± 8	64 ± 16
20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4 500 mM NaCl		26 ± 4	12 ± 3	59 ± 7	53 ± 6
20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4 250 mM NaCl		87 ± 1	54 ± 1	91 ± 7	84 ± 9
20 mM HEPES (NaOH) pH 7,4		78 ± 1	42 ± 1	74 ± 9	59 ± 10

Tabelle 15: Einfluss des Puffers und der Temperatur auf die relative Abnahme der Aktivität der Lysine B Bxz2gp12 und D29gp12 nach 21 bzw. nach 55 Tagen Lagerung

Die Puffer-Bedingung, von der ausgehend die Optimierung durchgeführt wurde ist grau hinterlegt.

Der Vergleich mit der Restaktivität der anderen für die Optimierung ausgewählten Puffer ergab für beide Lysine besser geeignete Lagerungsbedingungen. So zeigte der Puffer mit einem Zusatz von 30 % Glycerin für Bxz2gp12 das beste Resultat, da nach 21 Tagen noch kein Aktivitätsverlust

beobachtet wurde und nach 55 Tagen eine Restaktivität von circa 56 % erhalten war, was eine um circa Faktor 3,6 höhere Restaktivität ergab. Für D29gp12 hingegen wies der Puffer mit reduzierter Natriumchloridmolarität (250 mM) die geringsten Verluste auf, da eine um circa Faktor 1,6 höhere Restaktivität nach 55 Tagen Lagerung gemessen wurde. Die Lagerungsbedingung mit der Zugabe von 30 % Glycerin erbrachte auf D29gp12 das zweitbeste Ergebnis. In diesem Puffer wurden dabei nach 21 Tagen noch circa 86 % und nach 55 Tagen noch circa 64 % Restaktivität beobachtet, was einer Verbesserung von circa Faktor 1,5 bzw. Faktor 1,2 entsprach.

Als optimierter Lagerungspuffer wurde allerdings der Puffer mit Zusatz von Glycerin gewählt, da alle Proteine im gleichen Lagerungspuffer aufbewahrt werden sollten. Damit sollte eine bessere Vergleichbarkeit in der Aktivitätstestung ohne vorherige Dialyse ermöglicht werden.

3.2.5. Thermische Stabilisierung von Lysin B D29gp12 mittels Mutagenese

Die thermische Stabilität ist ein wichtiges Kriterium für eine mögliche Anwendung eines Proteins als Wirkstoff. Daher wurde von Dr. Heike Stür (Biochemie II, Regensburg) an Lysin B D29gp12 exemplarisch untersucht, ob eine verbesserte Stabilität des Proteins durch Mutagenese erreicht werden kann.

Zunächst wurden dafür aus bioinformatischen Vorhersagen zehn Varianten mit dem höchsten stabilisierenden Effekt (siehe Tabelle 16) ausgewählt und rekombinant hergestellt. Die anschließende Schmelzpunktbestimmung der löslich exprimierenden Varianten zeigte, dass die Mutationen H177Y und G184I tatsächlich einen stabilisierenden Effekt von + 2,4 °C bzw. + 4,4 °C ergaben. Um auszuschließen, dass die Stabilisierung eine Reduktion der Aktivität zur Folge hat, wurde die *in vitro* Aktivität der stabilisierenden Varianten im Vergleich zu dem Wildtyp-Protein bestimmt. Dabei wurde keine Reduktion, sondern eine vergleichbare Aktivität für die Variante G184I und sogar eine auf circa 171 % gesteigerte Aktivität für die Variante H177Y beobachtet. Eine eindeutige Erklärung für den Effekt von H177Y auf die Aktivität war auf Basis der vorliegenden Informationen allerdings nicht möglich.

In einem nächsten Schritt wurden diese Mutationen vereinigt, um zu analysieren ob ein additiver Effekt vorliegt. Für die Doppelmutante H177Y G184I wurde dabei eine Stabilisierung von + 6,2 °C gemessen, was den additiven Effekt belegte. Die *in vitro* Aktivität der Doppelmutante war mit circa 114 % geringfügig erhöht, was den Schluss nahelegt, dass die Kombination der Mutationen keinen negativen Einfluss auf den Substratumsatz aufweist. Allerdings zeigte dieses Ergebnis auch, dass der Effekt von H177Y auf die *in vitro* Aktivität durch die Mutation G184I wieder abgeschwächt wurde.

Im nächsten Schritt wurde die Position G₁₈₄ näher untersucht, da sie sich im Gegensatz zu H₁₇₇, nicht an der Oberfläche, sondern im Kern des Proteins befand. Dafür wurden Varianten hergestellt, die im

Hintergrund der H177Y Mutation einen Austausch von Glycin₁₈₄ zu Leucin, Methionin, Prolin, Valin oder Alanin statt zu Isoleucin enthielten. Dabei konnte für die Varianten H177Y G184L, H177Y G184M, H177Y G184V und H177Y G184A eine weitere Stabilisierung erreicht werden. Die Austausche zu Leucin und Methionin zeigten allerdings einen größeren Effekt von gesamt + 9,6 °C bzw. + 8,8 °C, während die Austausche zu Valin und Alanin nur eine geringe Verbesserung um + 6,7 °C und + 6,4 °C ergaben. Die Variante H177Y G184P hingegen zeigte eine Destabilisierung des Proteins um - 1,4 °C, was auf die Lokalisation der Mutation in einer α -Helix zurückgeführt wurde.

Einfluss der eingeführten Mutationen auf die thermische Stabilität			
D29gp12-H Variante	mittlerer T_M [°C]	ΔT_M [°C]	relative <i>in vitro</i> Aktivität
wt	54,3	-	100 % \pm 8 %
E65M	53,6	- 0,7	n. b.
D164M	53,8	- 0,5	n. b.
H94Y	52,7	- 1,6	n. b.
H108Y	53,8	- 0,5	n. b.
D25M	45,4	- 8,9	n. b.
D75M	53,7	- 0,6	n. b.
D166M	Protein unlöslich		
A219I	54,0	- 0,3	n. b.
H177Y	56,7	+ 2,4	171 % \pm 35 %
G184I	58,7	+ 4,4	100 % \pm 5 %
H177Y G184I	60,5	+ 6,2	114 % \pm 4 %
H177Y G184L	63,9	+ 9,6	100 % \pm 15 %
H177Y G184M	63,1	+ 8,8	71 % \pm 4 %
H177Y G184P	52,9	- 1,4	186 % \pm 33 %
H177Y G184V	61,0	+ 6,7	114 % \pm 17 %
H177Y G184A	60,7	+ 6,4	143 % \pm 28 %

Tabelle 16: Schmelzpunkte und relative Aktivitäten der D29gp12-Varianten

T_M bezeichnet die gemessene Schmelztemperatur und n.b. die nicht bestimmten Werte. Die Standardabweichung der *in vitro* Aktivitätsbestimmung wurde mit $n = 3$ bestimmt.

Die folgende Analyse der *in vitro* Aktivitäten der Doppelmutationsvarianten zeigte, dass die Austausche zu Leucin bzw. Valin nur einen geringen Effekt hatten und circa 100 % bzw. 114 % Substratumsatz aufwiesen. Für die H177Y G184M Variante wurde hingegen eine Reduktion der *in vitro* Aktivität auf circa 71 % beobachtet. Die Austausche zu Alanin bzw. Prolin hatten allerdings einen positiven Effekt auf die *in vitro* Aktivität und führten zu einem erhöhten Substratumsatz von circa 143 % bzw. 186 %.

Zusammenfassend ergab sich aus diesen Untersuchungen, dass der größte stabilisierende Effekt um + 9,6 °C auf 63,9 °C mit der Doppelmutante H177Y G184L ohne einen Aktivitätsverlust erreicht wurde. Zudem konnten stabilisierte Mutanten mit erhöhter Aktivität identifiziert werden, wobei die

Einfachmutante H177Y + 2,4 °C und circa 171 % Substratumsatz und die Doppelmutante H177Y G184A + 6,4 °C und circa 143 % *in vitro* Aktivität aufwies.

3.2.6. NanoDSF Untersuchung des Einflusses der Fusion von Lysin B D29gp12 mit dem Peptid

pK34 auf die thermische Stabilität

Aufgrund der Bedeutung der thermischen Stabilität für die Wirkstoffentwicklung wurde auch der Einfluss der Fusion des Lysins mit einem Peptid entsprechend untersucht. Dabei wurden nanoDSF Experimente durchgeführt, um die Proteine im Lagerungspuffer untersuchen zu können. Da allerdings durch den am C-Terminus codierten His-Tag ein längeres Verbindungsstück zwischen Lysin und C-terminal fusionierten Peptid lag, waren die Ergebnisse dieser Fusion nicht direkt auf die N-terminale Fusion übertragbar.

nanoDSF Denaturierungsexperimente mit D29gp12 und den Fusionen mit dem Peptid pK34

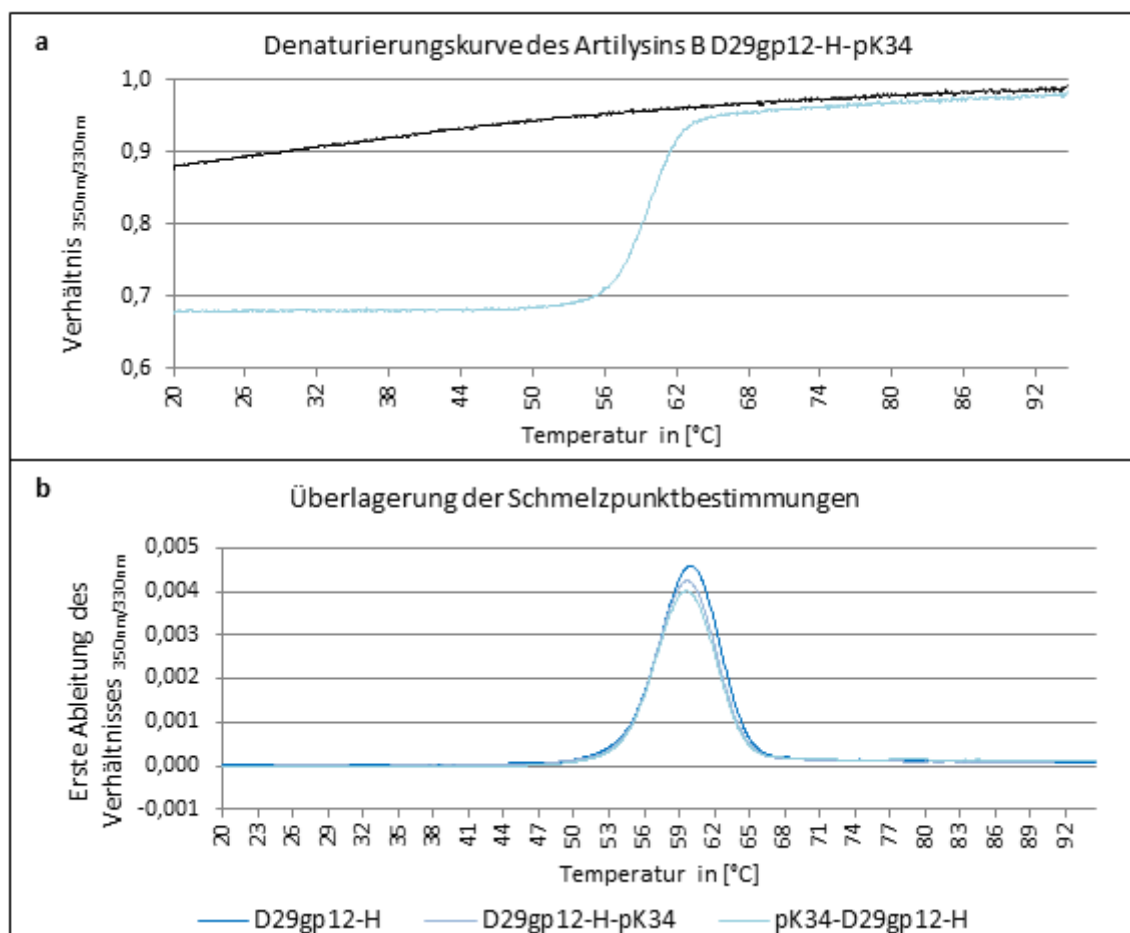


Abbildung 14: (a) Denaturierungskurve des Artilylins B D29gp12-H-pK34; (b) Überlagerung der ersten Ableitung der gemessenen nanoDSF-Schmelzkurven des Lysin B D29gp12-H und der Artilylins B D29gp12-H-pK34 und pK34-D29gp12-H

(a) Die Entfaltungskurve ist in blau und die zugehörigen Negativkontroll-Messung in schwarz wiedergegeben. (b) Die erste Ableitung des Verhältnisses $_{350nm/330nm}$ des Lysin B D29gp12-H ist in blau und die Kurven der Artilylins B D29gp12-H-pK34 und pK34-D29gp12-H sind in hellblau dargestellt.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, zeigte das Lysin B D29gp12 bei den nanoDSF Messungen eine Schmelztemperatur von 60,2 °C. Diese war um circa 6 °C höher als der aus den CD-Messungen erhaltene T_M von 54,3 °C, was auf den stabilisierenden Effekt des inzwischen verwendeten Lagerpuffers zurückgeführt wurde. Die gemessenen Schmelztemperaturen der Fusionsproteine mit dem pK34 Peptid ergaben mit 59,8 °C (D29gp12-H-pK34) bzw. 59,9 °C (pK34-D29gp12-H) nur sehr geringe Differenzen von - 0,4 °C bzw. - 0,3 °C, die als nicht signifikant beurteilt wurden.

Damit belegten die Ergebnisse, dass die Fusion mit pK34 an beiden Termini keinen relevanten Einfluss auf die thermische Stabilität von D29gp12 hat. Zudem zeigte der fast identische Schmelzpunkt der beiden Artilyesine, dass das durch den His-Tag längere Verbindungsstück am C-Terminus keinen Effekt erzeugte.

3.3. Bestimmung der *in vitro* Aktivität der rekombinant hergestellten Lysine

3.3.1. Bestimmung der Aktivität auf nicht-nativem Substrat

Für die spätere Anwendung ist es essentiell, dass rekombinant erzeugte Lysine bzw. Artilyesine enzymatisch aktiv sind. Um dies zu prüfen wurde die *in vitro* Aktivität auf nicht-nativem Substrat untersucht.

Lysine A, die Bindungen im Peptidoglykan spalten, wurden dazu mit einer von Henry M. *et al.*, 2010 abgewandelten Variante des Chloroform-Testes untersucht. Bei dieser Methode wird die Tatsache genutzt, dass *E. coli* genauso wie *M. smegmatis* den Peptidoglykan-Typ A1 γ aufweist, wobei sich die Modifikationen zwischen den Spezies unterscheiden. Deswegen kann hier ein negatives Ergebnis nicht zwingend auf fehlende Enzymaktivität zurückgeführt werden, wie Pohane A. A. *et al.*, 2014 für D29gp10 belegen konnten. Ein positives Ergebnis zeigt jedoch eine Hydrolyse des Peptidoglykans und damit enzymatische Aktivität an.

Allerdings wurden bei den Experimenten relativ große Schwankungen beobachtet, die zu einer hohen Standardabweichung führten. Da auch die nicht-induzierten Kontrolle derartige Schwankungen aufwies, wurde gefolgert, dass dieser Effekt methodisch bedingt war und zumindest partiell auf der unterschiedlich starken OD Reduktion durch chloroformgesättigtes LB-Medium beruhte. Dennoch konnte wie in Abbildung 15 dargestellt, die enzymatische Aktivität von Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 mit und ohne CBD, sowie von L5gp10 bestimmt werden. Dabei zeigten Bxz2gp11, Bxz2gp11 Δ CBD, D29gp10 Δ CBD und TM4gp29 eine klare Reduktion der OD, während D29gp10, L5gp10 und TM4gp29 Δ CBD unter diesen Testbedingungen keine enzymatische Aktivität aufwiesen. Allerdings war für Bxz2gp11 auffällig, dass die CBD Deletionsvariante eine geringfügig höhere Reduktion der OD als das Volllängenprotein ergab, wobei dieser Effekt in Anbetracht der Schwankungen nicht signifikant war. Zudem bestätigten die Ergebnisse für D29gp10 und

D29gp10 Δ CBD die Resultate von Pohane A. A. *et al.*, dass die CBD von D29gp10 die enzymatische Aktivität auf Peptidoglykan von *E. coli* verhindert (Pohane A. A. *et al.*, 2014). Auch die Beobachtungen von Henry M. *et al.* wurden bestätigt, dass rekombinant erzeugtes TM4gp29 auf Peptidoglykan von *E. coli* aktiv ist (Henry M. *et al.*, 2010), wobei die hier gezeigten Ergebnisse weiterhin belegten, dass die Deletion der Zellwand-Bindedomäne die Hydrolyse des Peptidoglykans von *E. coli* durch TM4gp29 eliminierte.

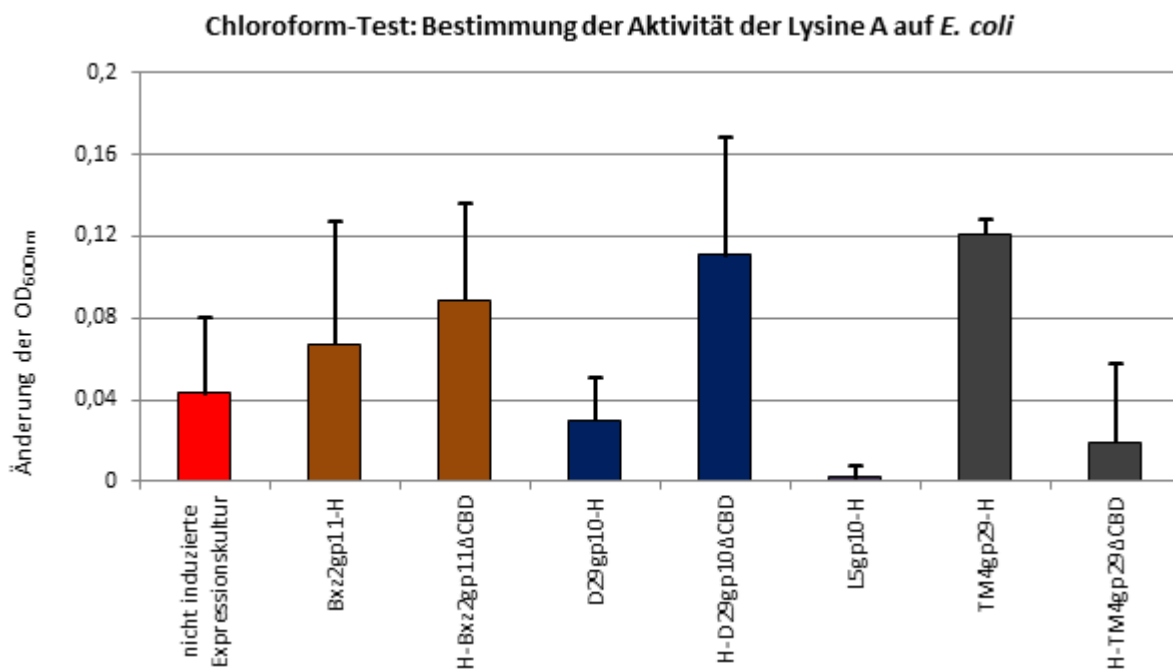


Abbildung 15: Chloroform-Test zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Lysine A auf Peptidoglykan von *E. coli* BL21 (DE3)

Δ CBD stellt die Lysin A Varianten mit Deletion der Zellwand-Bindedomäne dar. Die Messungen wurden entsprechend 2.2.7.1. durchgeführt und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung mit $n \geq 3$ wieder.

Für die Lysine B, die die Esterbindung zwischen Mykolsäuren und Arabinogalaktan spalten, wurde ein von Gilham D. und Lehner R., 2005 abgewandelter Esterase-Aktivitätstest für die Bestimmung der *in vitro* Aktivität auf dem Substrat 4-Nitrophenylacetat genutzt.

Dabei wurde für alle vier Lysine B, sowohl für die Varianten mit N-terminalem als auch mit C-terminalem His-Tag eine enzymatische Aktivität beobachtet (siehe Abbildung 16), wobei Bxz2gp12 von den vier Lysinen B den höchsten Substratumsatz zeigte. Die *in vitro* Aktivität der H-Bxz2gp12 Variante war zudem um circa Faktor 1,5 höher, woraus gefolgert wurde, dass die Modifikation des C-Terminus weniger geeignet war, um einen optimalen Substratumsatz zu erhalten. Bei D29gp12 zeigte hingegen die Variante mit dem C-terminalen His-Tag einen um circa Faktor 1,5 höheren Substratumsatz, was dem entgegengesetzten Effekt entsprach. Für L5gp12 und TM4gp30 konnte allerdings keine Aussage über den Einfluss der Position des His-Tag gemacht werden, da die

Unterschiede in Anbetracht des potentiellen Fehlers bei der Proteinkonzentrationsbestimmung zu gering waren.

Somit konnte für die vier Lysine B eine enzymatische Esterase-Aktivität gezeigt werden. Zudem belegten die Ergebnisse, dass prinzipiell beide Termini für die Modifikation mit dem His-Tag genutzt werden können, ohne die enzymatische Aktivität zu eliminieren, aber bei Bxz2gp12 und D29gp12 ein schwacher Einfluss des gewählten Terminus auf den Substratumsatz beobachtet werden konnte.

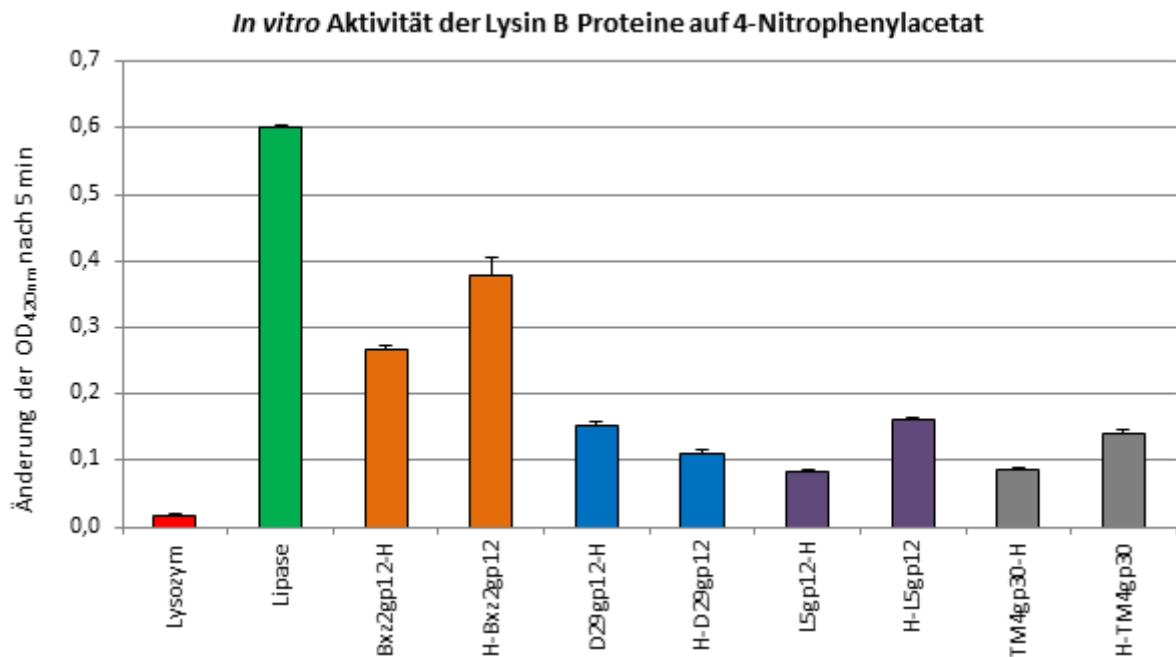


Abbildung 16: Esterase-Aktivitätstest für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Lysine B auf 4-Nitrophenylacetat als Substrat

Die Messungen wurden wie unter 2.2.7.2. beschrieben durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, wobei $n = 3$ betrug. Lysozym wurde als Negativkontrolle und Lipase (*P. fluorescens*) wurde als Positivkontrolle verwendet.

3.4. Einfluss des pH-Wertes und der Natriumchloridmolarität auf die *in vitro* Aktivität der

Lysine B

Da die enzymatische Aktivität der Lysine B gezeigt werden konnte, wurde als nächstes der Einfluss des pH-Wertes und der Natriumchloridmolarität auf den Substratumsatz untersucht.

Zur Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes wurde aufgrund der Ergebnisse von Hou L. *et al.*, die für D29gp12 auf dem Substrat *p*-Nitrophenylbutyrat ein Optimum bei pH 7,5 bestimmt hatten (Hou L. *et al.*, 2010), der pH-Bereich von pH 6 bis pH 9 gewählt.

Wegen der begrenzten Pufferkapazität des HEPES Puffers, wurden die Experimente zusätzlich in dem MOPS Puffer, der zwischen pH 6 bis pH 8 verwendet wurde, und TRICINE Puffer, der zwischen pH 7 bis pH 9 verwendet wurde, durchgeführt. Um einen Puffereffekt ermitteln zu können und dadurch eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen pH-Stufen zu ermöglichen, wurde die Messung bei

pH 7 und bei pH 8 in allen drei Puffersystemen durchgeführt. Zudem wurde bei allen Experimenten eine Kontrolle des thermischen Zerfalls des Substrats als Korrekturfaktor verwendet, um die pH-Wert abhängige Hydrolyse des Substrats 4-Nitrophenylacetat auszugleichen.

Esterase-Aktivitätstest:
Einfluss von pH Wert und Natriumchloridmolarität auf den Substratumsatz der Lysine B

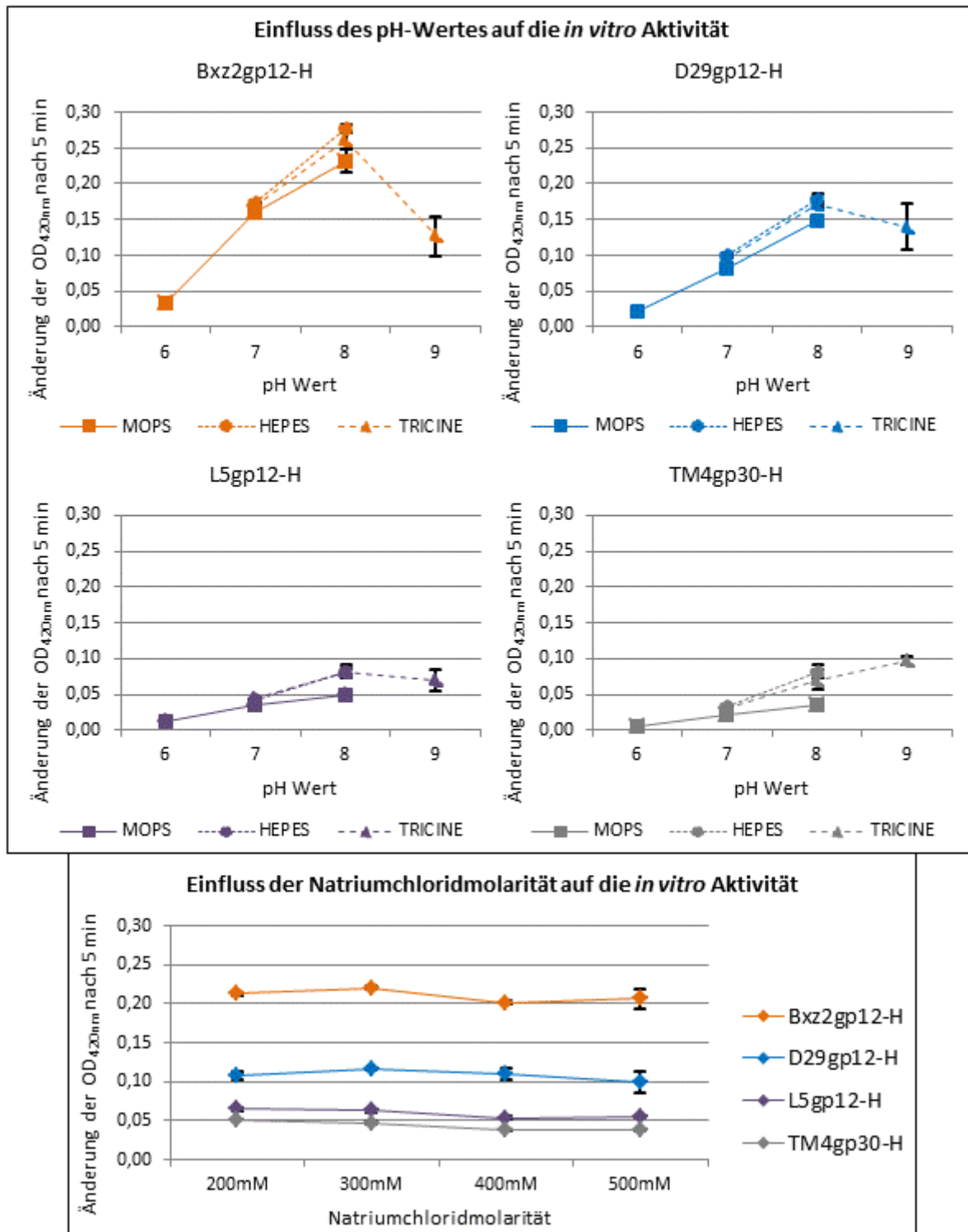


Abbildung 17: Esterase-Aktivitätstests zur Bestimmung des Einflusses des pH-Wertes und der Natriumchloridmolarität

Für die Messungen wurde entweder die Puffersubstanz oder die Natriumchloridmolarität entsprechend verändert. Die Messungen wurden mit den entsprechenden Substratlösungen gemäß 2.2.7.1. durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung mit $n = 3$ dar.

Wie in Abbildung 17 wiedergegeben, wurde dabei für alle vier Lysine B bei pH 6 die geringste *in vitro* Aktivität beobachtet. Bxz2gp12, D29gp12 und L5gp12 zeigten bei pH 7 und bei pH 9 einen intermediären Substratumsatz. Die maximale *in vitro* Aktivität wurde bei pH 8 erreicht. TM4gp30 wies hingegen eine kontinuierliche Zunahme von etwa 30 % des maximalen Substratumsatzes bei pH 7 und etwa 70 % bei pH 8 bis zu dem Maximum bei pH 9 auf.

Bei der Bestimmung des Einflusses der Natriumchloridmolarität bei pH 7,4 zeigten alle vier Lysine B einen geringfügig niedrigeren Substratumsatz bei 400 mM und 500 mM Natriumchlorid. Der beobachtete, geringe Einfluss auf die *in vitro* Aktivität wurde in Anbetracht der Abweichungen jedoch als nicht relevant erachtet.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass ein schwach basischer pH-Wert für die enzymatische Aktivität der Lysine B ideal ist und dass das Optimum von Bxz2gp12, D29gp12 und L5gp12 bei pH 8 liegt. Für TM4gp30 konnte keine klare Aussage getroffen werden, da der maximale Substratumsatz bei pH 9 und damit am Rand des getesteten pH-Bereichs beobachtet wurde. Im Gegensatz zum pH-Wert zeigte die Natriumchloridmolarität keinen signifikanten Einfluss auf die *in vitro* Aktivität und wurde deswegen für die weiteren Untersuchungen vernachlässigt.

3.4.1. Einfluss der Fusion aus Lysin B und Peptid auf die *in vitro* Esterase-Aktivität

Für die Lysin B basierten Artilylsine wurde der Einfluss der Fusion mit antimikrobiellen Peptiden auf die *in vitro* Aktivität untersucht.

Einfluss der Fusion der Lysin B Kandidaten mit ausgewählten AMPs auf die <i>in vitro</i> Aktivität			
Bxz2gp12		D29gp12	
Variante	relative <i>in vitro</i> Aktivität	Variante	relative <i>in vitro</i> Aktivität
Bxz2gp12-H	100 % \pm 0,6 %	D29gp12-H	100 % \pm 2,3 %
Bxz2gp12-H-PK	99,2 % \pm 0,6 %	D29gp12-H-LL-37	50,1 % \pm 2,5 %
PK-Bxz2gp12-H	155,4 % \pm 9,8 %	D29gp12-H-PK	101,7 % \pm 2,9 %
		D29gp12-H-pK34	97,7 % \pm 10,8 %
		D29gp12-H-SMAP-29	69,7 % \pm 0,6 %
		LL-37-D29gp12-H	65,9 % \pm 1,0 %
		PK-D29gp12-H	95,1 % \pm 2,7 %
		pK34-D29gp12	92,4 % \pm 5,2 %
		SMAP-29-D29gp12-H	47,7 % \pm 1,3 %

Tabelle 17: Relative *in vitro* Aktivitäten der Bxz2gp12- und D29gp12-Artilylsine

Die C-terminale Fusion mit dem PK Peptid zeigte bei Bxz2gp12 keinen Effekt auf den Substratumsatz, während die N-terminale Fusion eine Steigerung der *in vitro* Aktivität auf circa 155 % ergab (siehe Tabelle 17). Eine klare Begründung für diesen Effekt konnte jedoch nicht gefunden werden.

Die D29gp12 basierten Artily sine hingegen wiesen sowohl für die C- als auch für die N-terminale Fusion mit den Peptiden PK bzw. pK34 keine signifikante Veränderung der *in vitro* Aktivität auf. Für Konstrukte mit den Peptiden LL-37 bzw. SMAP-29 wurde eine deutliche Reduktion des Substratumsatzes beobachtet. Da diese Fusionen zudem deutlich reduzierte lösliche Ausbeuten und Reinheiten zeigten (siehe 3.1.2.) war keine eindeutige Begründung für die geringere *in vitro* Aktivität der Proteine möglich.

3.5. Aktivität von ausgewählten Lysinen A, Lysinen B und Artily sinen auf lebenden

Mykobakterien

Vorversuche auf mykobakteriellen Zellen zeigten, dass die für die Experimente notwendigen Mengen und Molaritäten für Bx2gp12 aufgrund der geringen löslichen Expressionsausbeute nicht erreicht wurden. Daher wurde dieses Lysin B und die darauf basierenden Artily sine nicht weiter verwendet und die Experimente in der Folge mit dem Lysin B D29gp12 und darauf basierenden Artily sinen durchgeführt.

3.5.1. Bestimmung der Reduktion der Koloniebildenden Einheiten unter Verwendung des Standard-Aktivitätstestes

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität eines Wirkstoffes ist die Untersuchung der Reduktion der Zahl der Koloniebildenden Einheiten eine gängige Methode und wird auch für Mykobakterien angewendet. Allerdings erzeugt das Verklumpen der Zellen Schwankungen der erhaltenen KBE Zahlen, was relativ hohe Standardabweichungen zur Folge haben kann.

Um geeignete Bedingungen zu finden, wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt und es wurde eine Proteinmolarität von 5 μM (siehe Anhang 9), eine Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen pro ml und der Standard-Aktivitätstest-Puffer als ein passendes System ermittelt. Außerdem wurde untersucht, welche Inkubationszeit für eine volle Aktivität des Proteins nötig war und die volle Aktivität von $\geq 7 \log_{10}$ Reduktion auf *M. smegmatis* SMR5 nach 20 h Inkubation bei RT erreicht (siehe Tabelle 18). Diese Bedingung wurde daher für alle folgenden Experimente gewählt.

Standard-Aktivitätstest für die Bestimmung der Zeitabhängigkeit des antimykobakteriellen Effektes					
Ansatz	Protein	Log ₁₀ Reduktion der KBE nach einer Inkubation bei RT für			
		2 h	4 h	8 h	20 h
Lysin B	D29gp12-H	4,5 \pm 2,6	6,4 \pm 0,3	6,7 \pm 0,3	≥ 7

Tabelle 18: Zeitabhängigkeit der antimykobakteriellen Wirkungen auf *M. smegmatis* SMR5

Das Detektionslimit lag bei 7 log₁₀ Reduktion. Die Standardabweichung wurde mit n = 3 angegeben.

Dann wurde für das Lysin A D29gp10, das Lysin B D29gp12 und die Fusionen des PK Peptides mit Lysin B D29gp12 die Reduktion der KBE von *M. smegmatis* SMR5 bestimmt (siehe Tabelle 19).

Für Lysin A wurde dabei keine Reduktion beobachtet, während für alle Lysin B oder Artilysin B enthaltenden Bedingungen das Detektionslimit der KBE Reduktion ($7 \log_{10}$) erhalten wurde. Bei der Kombination aus Lysin A und dem Artilysin B D29gp12-H-PK trat eine Schwankung auf, da in einem Experiment in einer Verdünnungsstufe KBEs beobachtet wurden, die nicht sicher als Kontamination eingestuft werden konnten.

Die Ergebnisse auf *M. smegmatis* SMR5 zeigten somit, dass das Lysin B D29gp12 auch ohne das Lysin A D29gp10 eine vollständige Eliminierung der KBE erzeugt. Da in allen Tests das Detektionslimit erreicht wurde, konnte keine Aussage über einen möglichen synergistischen Effekt von Lysin A und Lysin B getroffen werden. Auch eine mögliche Verbesserung der antimykobakteriellen Aktivität durch die Fusion mit dem PK Peptid konnte unter diesen Bedingungen nicht untersucht werden, wobei die Ergebnisse belegten, dass auch diese Artilyesine gegen *M. smegmatis* SMR5 wirksam sind.

Standard-Aktivitätstest zur Bestimmung der KBE Reduktion auf <i>M. smegmatis</i> SMR5		
Ansatz	Proteine	\log_{10} Reduktion der KBE
Lysin A	D29gp10-H	$0,0 \pm 0,3$
Lysin B	D29gp12-H	≥ 7
Artilysin B	D29gp12-H-PK	≥ 7
	PK-D29gp12-H	≥ 7
Lysin A und Lysin B	D29gp10-H + D29gp12-H	≥ 7
Lysin A und Artilysin B	D29gp10-H + D29gp12-H-PK	$6,2 \pm 1,2$
	D29gp10-H + PK-D29gp12-H	≥ 7
4 h Vorinkubation mit Lysin B und folgende Zugabe von Lysin A	D29gp10-H + D29gp12-H	≥ 7
4 h Vorinkubation mit Artilysin B und folgende Zugabe von Lysin A	D29gp10-H + D29gp12-H-PK	≥ 7
	D29gp10-H + PK-D29gp12-H	≥ 7

Tabelle 19: Standard-Aktivitätstest der KBE Reduktion auf *M. smegmatis* SMR5

Das Detektionslimit lag bei $7 \log_{10}$ Reduktion, die erhaltene Standardabweichung wurde als Fehler angegeben, wobei $n \geq 3$ betrug.

Für *M. fortuitum* hingegen lag die erhaltene Reduktion der KBE unterhalb des Detektionslimits (siehe Tabelle 20). Daher waren Rückschlüsse bezüglich des Synergismus und des Effektes der Fusionsproteine bei *M. fortuitum* möglich.

Jedoch wurde auch bei diesen Experimenten für die Lysine A, D29gp10 und TM4gp29, keine Reduktion beobachtet. Zudem führte die Fusion des pK34 Peptides an den N-Terminus von TM4gp29 zu keiner erhöhten Reduktion. Für das Lysin B D29gp12 hingegen wurde eine Reduktion der KBE von circa $3,6 \log_{10}$ erhalten, was eine sehr gute Aktivität anzeigte. Auch die Fusionen mit dem PK Peptid zeigten gute Aktivität, wobei die C- und die N-terminale Fusion eine im Rahmen der Schwankungen vergleichbare Reduktion von circa $3,4 \log_{10}$ bzw. circa $2,6 \log_{10}$ ergaben. Da die Artilyesine keine Zunahme der KBE Reduktion aufwiesen wurde gefolgert, dass die Fusion mit dem PK Peptid die antimykobakterielle Wirkung auf *M. fortuitum* nicht verbesserte.

Standard-Aktivitätstest zur Bestimmung der KBE Reduktion auf <i>M. fortuitum</i>		
Ansatz	Proteine	Log ₁₀ Reduktion der KBE
Lysin A	D29gp10-H	-0,1 ± 0,1
	TM4gp29-H	0,0 ± 0,1
Artilysin A	pK34-TM4gp29-H	0,0 ± 0,1
Lysin B	D29gp12-H	3,6 ± 1,5
Artilysin B	D29gp12-H-PK	2,6 ± 0,8
	PK-D29gp12-H	3,4 ± 1,2
Lysin A und Lysin B	D29gp10-H + D29gp12-H	2,1 ± 1,7
	TM4gp29-H + D29gp12-H	1,8 ± 0,2
4 h Vorinkubation mit Lysin B und folgende Zugabe von Lysin A	D29gp10-H + D29gp12-H	2,5 ± 1,4
Artilysin A und Lysin B	pK34-TM4gp29-H + D29gp12-H	2,3 ± 0,5
Lysin A und Artilysin B	D29gp10-H + D29gp12-H-PK	1,7 ± 0,5
	D29gp10-H + PK-D29gp12-H	2,4 ± 1,6
4 h Vorinkubation mit Artilysin B und folgende Zugabe von Lysin A	D29gp10-H + D29gp12-H-PK	1,5 ± 0,4
	D29gp10-H + PK-D29gp12-H	2,1 ± 1,4
Artilysin A und Artilysin B	pK34-TM4gp29-H+D29gp12-H-PK	2,2 ± 0,2
	pK34-TM4gp29-H+PK-D29gp12-H	1,9 ± 0,5

Tabelle 20: Standard-Aktivitätstest der KBE Reduktion auf *M. fortuitum*

Das Detektionslimit lag bei 7 log₁₀ Reduktion und die erhaltene Standardabweichung wurde als Fehler angegeben, wobei $n \geq 3$ betrug.

Zudem konnte auch der mögliche Synergismus zwischen Lysin A bzw. Artilysin A und Lysin B bzw. Artilysin B untersucht werden. Die Ergebnisse zeigten allerdings, dass die Kombinationen in allen Fällen eine niedrigere Reduktion der KBE aufwiesen. Auch die Vorinkubation mit Lysin B bzw. Artilysin B, um die Zugänglichkeit des Peptidoglykans für das Lysin A bzw. Artilysin A zu erhöhen, erzeugte keine gesteigerte Wirkung der Mischung mit Lysin A bzw. Artilysin A.

Damit belegten die Beobachtungen, dass bei diesen Bedingungen kein synergistischer Effekt zwischen Lysin A und Lysin B vorlag.

3.5.2. BactecMGIT 960 basierter Nachweis der Wachstumsinhibition

In der Folge wurde der antimykobakterielle Effekt auf Wachstum in Flüssigmedium mit dem BactecMGIT 960 System untersucht. Die Zahl der lebenden und teilungsfähigen Zellen in der für die Beimpfung verwendeten Probe wurde dabei durch die Behandlung mit den Analyten verändert und damit änderte sich die Zeit, die für das Erreichen des Detektionslimits von circa $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml nötig war.

Wie in der Tabelle 21 dargestellt, zeigten die am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführten Wachstumsinhibitionsuntersuchungen mit *M. smegmatis* SMR5, *M. fortuitum* und *M. bovis* BCG, dass die benötigten Inkubationszeiten für die Lysin A Proben mit denen der Wachstumskontrolle vergleichbar waren und damit kein inhibitorischer

Effekt erhalten wurde. Auch für die auf TM4gp29 basierenden Artily sine A mit N-terminaler Peptidfusion wurde diese Beobachtung gemacht. Bei den C-terminalen Peptidfusionen an TM4gp29 ergaben sich unterschiedliche Resultate. Für *M. smegmatis* SMR5 wurde dabei kein Effekt erhalten, während für *M. bovis* BCG eine deutlich erhöhte Wachstumsdetektionszeit beobachtet wurde, was eine deutliche Wachstumsinhibition zeigte. Daraus wurde gefolgert, dass es Unterschiede in der Adressierbarkeit zwischen den beiden Arten gibt und dass *M. bovis* BCG durch die C-terminale Fusion mit den Peptiden PK bzw. pK34 für das Artily sin A TM4gp29 adressierbar wurde.

Bei dem Lysin B D29gp12 bzw. den darauf basierenden Artily sinen wurde hingegen für *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum* auch nach acht Wochen Inkubation kein Wachstum detektiert, woraus geschlossen wurde, dass die Proteine eine vollständige Wachstumsinhibition bewirkten. Daher konnte jedoch für diese Arten keine Aussage über einen möglichen Synergismus und den Effekt der Peptid-Fusion gemacht werden.

Nachweis der Wachstumsinhibition mit dem BactectMGIT 960 System				
Ansatz	Proteine	Zeit der Wachstumsdetektion für		
		<i>M. smegmatis</i> SMR5	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Wachstumskontrolle	Lagerungspuffer	90 h	34 h	150 h
Lysin A	Bxz2gp11-H	92 h	31 h	167 h
	D29gp10-H	90 h	30 h	138 h
	TM4gp29-H	95 h	30 h	165 h
Artily sin A	TM4gp29-H-PK	100 h	n.b.	298 h
	TM4gp29-H-pK34	102 h	n.b.	281 h
	PK-TM4gp29-H	106 h	n.b.	168 h
	pK34-TM4gp29-H	104 h	n.b.	160 h
Lysin B	D29gp12-H	-	-	519 h
Artily sin B	D29gp12-H-pK34	-	n.b.	422 h
	pK34-D29gp12-H	-	n.b.	432 h
Lysin A und Lysin B	Bxz2gp11-H + D29gp12-H	-	-	n.b.
	D29gp10-H + D29gp12-H	-	-	n.b.
	TM4gp29-H + D29gp12-H	-	-	441 h
Artily sin A und Lysin B	TM4gp29-H-PK + D29gp12-H	-	n.b.	381 h
	TM4gp29-H-pK34 + D29gp12-H	-	n.b.	391 h
	PK-TM4gp29-H + D29gp12-H	-	n.b.	390 h
	pK34-TM4gp29-H + D29gp12-H	-	n.b.	575 h
Lysin A und Artily sin B	TM4gp29-H + pK34-D29gp12-H	-	n.b.	385 h
Artily sin A und Artily sin B	pK34-TM4gp29-H + pK34-D29gp12-H	-	n.b.	359 h
Vergleichsenzyme	50 µM Lysozym + 5 µM Lipase	-	95 h	574 h

Tabelle 21: Darstellung der in den BactecMGIT Experimenten erhaltenen Wachstumsdetektionszeiten

Mit n.b. sind die nicht bestimmten Werte angezeigt und - zeigt kein Wachstum nach acht Wochen an.

Für *M. bovis* BCG wurde allerdings keine vollständige, aber eine sehr starke Wachstumsinhibition durch D29gp12 erhalten, was eine starke antimykobakterielle Aktivität belegte und eine

Untersuchung der möglichen Effekte der Mischung und der Fusionsproteine ermöglichte. Die Resultate zeigten dabei, dass die Kombinationsansätze und die Fusionen von dem pK34 Peptid mit D29gp12, bis auf die Kombination von pK34-TM4gp29-H mit D29gp12, keine Erhöhung sondern eine Reduktion der Wachstumsdetektionszeit aufwiesen. Dies belegte, dass die antimykobakterielle Aktivität bei den gewählten Bedingungen nicht verbessert, sondern verringert war. Im Gegensatz dazu zeigte die Kombination von pK34-TM4gp29-H mit D29gp12 eine im Vergleich zu der Wirkung der Einzelproteine deutliche Erhöhung der Wachstumsdetektionszeit, was auf einen synergistischen Effekt hinwies.

3.5.3. Quantifizierung von stoffwechselaktiven Zellen mit einem Luciferase-basierten ATP

Nachweis

Neben dem Wachstum ist die Stoffwechselaktivität ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Vitalität von Zellen. Daher wurden am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg ATP-Nachweis Experimente durchgeführt, um den Einfluss der Proteine auf die vorhandene Menge an ATP und damit auf die Stoffwechselaktivität der mykobakteriellen Zellen zu untersuchen.

Die erhaltenen Werte (siehe Tabelle 22) zeigten allerdings, dass die Messungen starke Schwankungen aufwiesen, die bis zu 25 % betragen konnten. Daher konnten nur Veränderungen über 30 % verglichen werden. Folglich wurden die Änderungen die TM4gp29 und die N-terminalen Peptidfusionen mit diesem Lysin A auf den drei Arten zeigten als kein Effekt bewertet. Zudem ergaben die C-terminalen Peptidfusionen mit TM4gp29 auf *M. smegmatis* und *M. fortuitum* keinen Effekt, während bei *M. bovis* BCG eine starke Reduktion der ATP Menge erhalten wurde. Diese Beobachtungen stützten somit die Folgerung, dass *M. bovis* BCG durch die C-terminale Peptidfusion für TM4gp29 adressierbar wurde (siehe 3.4.2.).

Die Lysin B bzw. Artilysin B Ansätze zeigten für *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum* in allen Proben eine starke Reduktion der ATP Menge in der Zellsuspension und im Zellpellet, wodurch eine gute antimykobakterielle Aktivität der Proteine belegt wurde. Auch bei Experimenten mit *M. bovis* BCG wurde eine klare Reduktion der ATP-Menge beobachtet. Allerdings war das Signal der Zellsuspension und der pelletierten Zellen bei *M. bovis* BCG für die meisten Proben stark unterschiedlich, wobei die Zellsuspension deutlich höhere RLU Werte als die pelletierten Zellen aufwies. Dennoch wurde gefolgert, dass D29gp12 und die darauf basierenden Artily sine auch gegen *M. bovis* BCG eine starke antimykobakterielle Aktivität haben.

Luciferase basierter ATP Nachweis				
Ansatz	Proteine	Δ RLU der Zellsuspension / der pelletierten Zellen in [% des Signals der Wachstumskontrolle]		
		<i>M. smegmatis</i> SMR5	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Lysin A	TM4gp29-H	68 / 60	> 100 / 74	> 100 / 90
Artilysin A	TM4gp29-H-PK	75 / > 100	77 / 69	28 / 14
	TM4gp29-H-pK34	66 / > 100	69 / 54	32 / 22
	PK-TM4gp29-H	> 100 / > 100	76 / 68	> 100 / > 100
	pK34-TM4gp29-H	94 / 69	89 / 75	> 100 / 100
Lysin B	D29gp12-H	3 / 4	22 / 15	21 / 5
Artilysin B	D29gp12-H-PK	n.b.	n.b.	3 / 2
	D29gp12-H-pK34	n.b.	n.b.	39 / 8
	PK-D29gp12-H	n.b.	n.b.	3 / 2
	pK34-D29gp12-H	3 / 4	15 / 9	42 / 8
Lysin A + Lysin B	TM4gp29-H + D29gp12-H	2 / 3	11 / 17	38 / 7
Lysin A + Artilysin B	TM4gp29-H + pK34-D29gp12-H	2 / 3	8 / 10	42 / 8
Artilysin A + Lysin B	TM4gp29-H-PK + D29gp12-H	2 / 3	9 / 14	38 / 8
	TM4gp29-H-pK34 + D29gp12-H	2 / 3	15 / 13	43 / 8
	PK-TM4gp29-H + D29gp12-H	2 / 3	9 / 13	36 / 8
	pK34-TM4gp29-H + D29gp12-H	2 / 3	21 / 14	40 / 8
Artilysin A + Artilysin B	pK34-TM4gp29-H + pK34-D29gp12-H	3 / 3	8 / 14	41 / 7
Vergleichsenzyme	50 μ M Lysozym + 5 μ M Lipase	3 / 7	23 / 50	18 / 4

Tabelle 22: Ergebnisse des Luciferase-basierten ATP-Nachweises

RLU ist die Einheit *Relative Light Units* und n.b. sind nicht bestimmte Werte. Die Standardabweichung konnte aufgrund der Messungsanzahl nur mit der maximal erhalten als $\pm 25\%$ (Standardabweichung für D29gp12-H auf *M. bovis* BCG mit $n = 2$ erhalten, Daten nicht gezeigt) abgeschätzt werden.

3.5.4. Bestimmung der Reportergen-Kopienzahl mittels PMA-basierter PCR-Inhibition und qPCR

Ein weiteres Kriterium für die Schädigung der Zellen ist eine Destabilisierung der Membran, die unter anderem durch den Vergleich der DNA-Zugänglichkeit für PMA untersucht werden kann. Dabei wird genutzt, dass PMA keine intakten Membranen überwinden kann und deswegen nur bei geschädigter Membran eine Anlagerung an die DNA und damit eine PCR-Inhibition möglich ist (siehe 2.2.8.2.).

Die Experimente (siehe Tabelle 23), durchgeführt am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg, zeigten, dass die Lysine A keinen Einfluss auf die Reportgen-Kopienzahl und damit keine Wirkung auf die mykobakteriellen Zellen hatten. Das Lysin B D29gp12 und das Artilysin B D29gp12-H-PK ergaben hingegen bei *M. smegmatis* SMR5 und bei *M. fortuitum* eine sehr starke Reduktion der Kopienzahl auf unter 1 % bzw. auf unter 10 %. Somit wiesen diese Proteine eine starke antimykobakterielle Aktivität auf, wobei bei *M. fortuitum* ein geringfügig schwächerer Effekt beobachtet wurde. Für die Mischung aus Lysozym und Lipase zeigten *M. smegmatis* und *M. fortuitum* jedoch deutliche Unterschiede. Während diese Enzyme bei *M. smegmatis* mit der

Reduktion auf 1,6 % eine sehr gute Aktivität ergaben, wurde auf *M. fortuitum* keine Reduktion und damit keine Aktivität beobachtet. Da diese Mischung auch bei dem ATP Nachweis (siehe 3.4.3.) bei *M. fortuitum* höhere Werte und damit eine niedrigere Aktivität aufwies legte dies den Schluss nahe, dass die beiden Arten eine unterschiedliche Resistenz gegen die Kombination aus Lysozym und Lipase haben, wobei *M. fortuitum* eine höhere Resistenz aufweist.

Quantifizierung der hsp65 Kopienzahl durch qPCR			
Ansatz	Proteine	Anzahl der hsp65 Kopien in [% der Kopien-Zahl der Wachstumskontrolle]	
		<i>M. smegmatis</i> SMR5	<i>M. fortuitum</i>
Lysin A	Bxz2gp11	> 100	> 100
	D29gp10	94,3	> 100
	TM4gp29	> 100	> 100
Lysin B	D29gp12	0,2	4,8
Artilysin B	D29gp12-H-PK	0,3	1,3
Lysin A und Lysin B	Bxz2gp11 + D29gp12	0,0	2,6
	D29gp10 + D29gp12	0,0	5,8
	TM4gp29 + D29gp12	0,4	9,4
Lysin A und Artilysin B	D29gp10 + D29gp12-H-PK	0,1	4,9
	TM4gp29 + D29gp12-H-PK	0,0	2,5
Vergleichsenzyme	50 µM Lysozym + 5 µM Lipase	1,6	> 100

Tabelle 23: Relative Kopienzahl des Reportgens *hsp65*

3.5.5. Bestimmung der *minimal-inhibitory-concentration* (MIC) mittels Resazurin-Reduktion

Nachdem mit verschiedenen Methoden die Aktivität auf die mykobakteriellen Zellen gezeigt werden konnte, wurde als nächstes die für einen inhibitorischen Effekt nötige Proteinmenge untersucht. Dafür wurde eine gängige Methode, die Bestimmung der *minimal-inhibitory-concentration* (MIC), verwendet, wobei der Nachweis der lebenden Mykobakterien über die Reduktion des Farbstoffes Resazurin durch die Reduktions-Äquivalente der Zellen erfolgte (siehe 2.2.8.4. und Tabelle 24).

Für die Lysine A D29gp10 und TM4gp29 und für die TM4gp29 Fusionsproteine wurde dabei bis 1000 nM keine Hemmung des Wachstums der beiden getesteten *M. smegmatis* Stämme SMR5 und DSM 43468 beobachtet. Es konnte jedoch nicht geprüft werden ob höhere Dosen einen inhibitorischen Effekt hätten, da die Lysine A bzw. Artily sine A bei der Zugabe des 7H9-Wachstumsmediums bei Molaritäten über 1 µM aggregierten (Daten nicht gezeigt).

Lysin B D29gp12 ergab hingegen mit circa 16 nM bei SMR5 bzw. circa 20 nM bei DSM 43468 sehr gute MIC-Werte. Zudem zeigten die auf D29gp12 basierenden Artily sine mit MIC-Werten, die zwischen 20 nM und 35 nM lagen, ein vergleichbares Ergebnis. Somit wiesen sowohl D29gp12 als auch die Artily sine B eine hohe antimykobakterielle Aktivität auf, wobei die Fusion mit den Peptiden

LL-37, PK, pK34 oder SMAP-29 keine Steigerung der wachstumsinhibitorischen Wirkung gegen *M. smegmatis* erzeugt hatte.

Während für die Lysine und Artily sine auf beiden Stämmen vergleichbare MIC-Werte beobachtet wurden, ergaben sich für Lipase aus *P. fluorescens* große Unterschiede. So zeigte das Enzym auf *M. smegmatis* SMR5 mit circa 18 nM ein zu D29gp12 vergleichbares Resultat, wies jedoch bei DSM 43468 mit circa 40 nM eine circa doppelt so hohe MIC wie das Lysin B auf. Diese Beobachtung legte den Schluss nahe, dass beide Stämme unterschiedlich anfällig für Lipase sind. Somit wurde dieser Effekt nicht nur zwischen den beiden Arten *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum* (siehe 3.4.2. und 3.4.4.), sondern auch zwischen zwei Stämmen der Art *M. smegmatis* beobachtet.

<i>minimal-inhibitory-concentration auf M. smegmatis</i>					
Ansatz	Proteine	MIC in [nM]		MIC in [µg/ml]	
		M. smegmatis SMR5	M. smegmatis DSM 43468	M. smegmatis SMR5	M. smegmatis DSM 43468
Lysin A	D29gp10-H	> 1000	> 1000	> 55,89	> 55,89
	TM4gp29-H	> 1000	> 1000	> 59,65	> 59,65
Artily sin A	TM4gp29-H-PK	> 1000	> 1000	> 61,13	> 61,13
	TM4gp29-H-pK34	> 1000	> 1000	> 63,83	> 63,83
	PK-TM4gp29-H	> 1000	> 1000	> 61,30	> 61,30
	pK34-TM4gp29-H	> 1000	> 1000	> 64,00	> 64,00
Lysin B	D29gp12-H	16 ± 10	20 ± 7	0,47 ± 0,30	0,59 ± 0,21
Artily sin B	D29gp12-H-LL-37	18 ± 4	n.b.	0,62 ± 0,14	n.b.
	D29gp12-H-PK	24 ± 13	35 ± 15	0,75 ± 0,40	1,09 ± 0,47
	D29gp12-H-pK34	24 ± 16	23 ± 5	0,81 ± 0,54	0,78 ± 0,17
	D29gp12-H-SMAP-29	20	n.b.	0,66	n.b.
	LL-37-D29gp12-H	20	n.b.	0,69	n.b.
	PK-D29gp12-H	23 ± 9	23 ± 11	0,72 ± 0,28	0,72 ± 0,34
	pK34-D29gp12-H	22 ± 16	23 ± 11	0,74 ± 0,54	0,78 ± 0,37
	SMAP-29-D29gp12-H	28	n.b.	0,93	n.b.
Lysin B und Detergenz-Zugabe	D29gp12-H + 0,008 % (v/v) Triton X-100	7 ± 1	6 ± 1	0,21 ± 0,03	0,18 ± 0,03
	D29gp12-H + 0,2 % (v/v) Tween 80	8 ± 2	7 ± 1	0,24 ± 0,06	0,21 ± 0,03
Vergleichsenzym	Lipase (<i>P. fluorescens</i>)	18 ± 9	40 ± 14	0,59 ± 0,30	1,32 ± 0,46

Tabelle 24: *minimal-inhibitory-concentration* gemessen auf den *M. smegmatis* Stämmen SMR5 und DSM 43468

n.b.: Werte nicht bestimmt. > 1000: bis 1000 nM wurde kein inhibitorischer Effekt erhalten. Die erhaltene Standardabweichung der MIC-Werte wurde als Fehler angegeben, wobei für alle Proben außer LL-37-D29gp12-H und D29gp12-H-SMAP-29 $n \geq 3$ betrug. Für LL-37-D29gp12-H war $n = 1$ und für D29gp12-H-SMAP-29 war $n = 2$, daher wurde für diese Ergebnisse keine Standardabweichung angegeben.

Neben der Bestimmung der MIC wurde die Steigerung der antimykobakteriellen Aktivität des Lysin B D29gp12 durch die weitere Zugabe von Tween 80 bzw. Triton X-100 untersucht. Dazu wurde die Detergenzienzusammensetzung 0,0875 % v/v Tween 80 (D29gp12-H + 0,2 % v/v Tween 80) bzw. 0,002 % v/v Triton X-100 und 0,0375 % v/v Tween 80 (D29gp12-H + 0,008 % Triton X-100) verwendet. Dabei zeigten die Ergebnisse, dass die weitere Zugabe der Detergenzien eine Steigerung der

antimykobakteriellen Aktivität des Lysin B erzeugte, da D29gp12 für SMR5 eine um den Faktor 2 und für DSM 43468 eine um den Faktor 3 niedrigere MIC aufwies und weder Tween 80 noch Triton X-100 bei der verwendeten Konzentration eine Hemmung des Wachstums ergaben.

3.5.6. Lebend- Tot- Zell-Diskriminierung durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Visualisierung des Effektes der antimykobakteriellen Wirkung war ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Dafür wurde zunächst eine mikroskopische Überprüfung der Vitalität der Zellen durchgeführt und eine gängige Methode der Mikrobiologie, die Lebend-Tot-Färbung verwendet, wobei die Aufnahmen am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg erstellt wurden.

Zunächst wurde Anhand der Negativkontrolle Lagerungspuffer bei *M. smegmatis* SMR5 untersucht, ob die Zellen durch den Puffer bereits beeinträchtigt waren (siehe Abbildung 18 a). Die Aufnahmen zeigten, dass die Zellen größtenteils eine grün fluoreszierten und somit eine intakte Membran aufwiesen. Zudem wurde der geringe Anteil an Zellen mit einer roten oder gelben Fluoreszenz, also mit geschädigter Membran, als Fraktion der normalen Zell-Kultur betrachtet. Somit wurden die Mykobakterien durch den Puffer nicht geschädigt. Im Gegensatz dazu, zeigte der Ansatz mit der Mischung aus Lysozym und Lipase (siehe Abbildung 18 b) hauptsächlich rot oder gelb fluoreszierende Zellen, was die Schädigung der Membran und folglich die antimykobakterielle Wirkung belegte.

Während für Lysin A TM4gp29-H (siehe Abbildung 18 c) und Artilysin A TM4gp29-H-PK (siehe Abbildung 18 d) kein Effekt auf die Zellen beobachtet wurde, zeigten die Aufnahmen für das Lysin B D29gp12-H (siehe Abbildung 18 e, g, h) und das Artilysin B pK34-D29gp12-H (siehe Abbildung 18 f, i, j) hauptsächlich rot oder gelb fluoreszierende und folglich geschädigte Zellen. Daher wurde gefolgert, dass das Lysin B und das Artilysin B eine antimykobakterielle Aktivität gegen *M. smegmatis* SMR5 aufweisen, was den Ergebnissen der Aktivitätstestungen entsprach. Zudem wurde kein klarer synergistischer Effekt von Lysin A bzw. Artilysin A und Lysin B bzw. Artilysin B beobachtet. Allerdings konnte aufgrund der qualitativen Auswertung dieser Untersuchung ein möglicher Synergismus nicht ausgeschlossen werden.

Bei *M. fortuitum* zeigten die Aufnahmen vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 19). Allerdings erschien der Anteil der Zellen mit einer intakten Membran bei den Proben b und e bis j höher als bei den entsprechenden Ansätzen bei *M. smegmatis* SMR5, wobei mehrheitlich geschädigte Zellen vorlagen. Daher wurde vermutet, dass die antimykobakterielle Wirkung auf *M. fortuitum* geringer war, was durch die Beobachtungen der Standard-Aktivitätstestungen (siehe 3.4.1.) gestützt wurde.

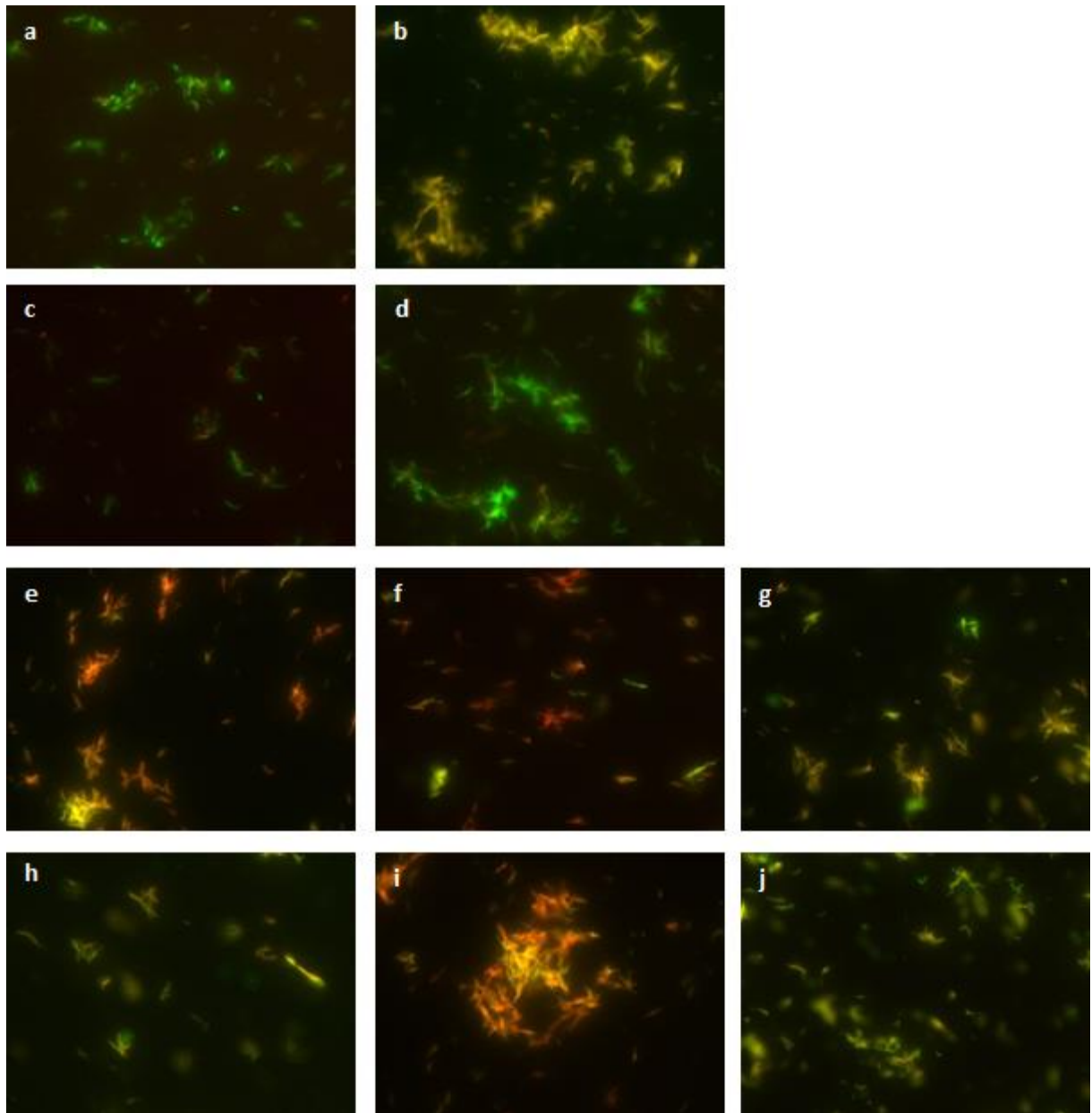


Abbildung 18: BacLight Lebend-Tot-Zelldiskriminierung der *M. smegmatis* SMR5 Proben

Die Aufnahmen der Kanäle rot und grün wurden wie unter 2.2.8.7. mit einem 40-Fach Objektiv bei 1,3-Fach digitalem Zoom erstellt und wurden dann vor der Überlagerung mit GIMP normalisiert. Unter a – j sind die Überlagerungen des roten und des grünen Kanals gezeigt.

Zellen mit einer intakten Membran sind grün. Bei einer Membranschädigung liegt ein Farbwechsel zu gelb bzw. rot vor.

Lagerungspuffer (Negativkontrolle) (a), 50 μ M Lysozym und 5 μ M Lipase (b), Lysin A TM4gp29-H (c), Artilysin A TM4gp29-H-PK (d), Lysin B D29gp12-H (e), Artilysin B pK34-D29gp12-H (f), Mischung aus TM4gp29-H und D29gp12-H (g), aus TM4gp29-H-PK und D29gp12-H (h), aus TM4gp29-H und pK34-D29gp12-H (i) und aus pK34-TM4gp29-H und pK34-D29gp12-H (j).

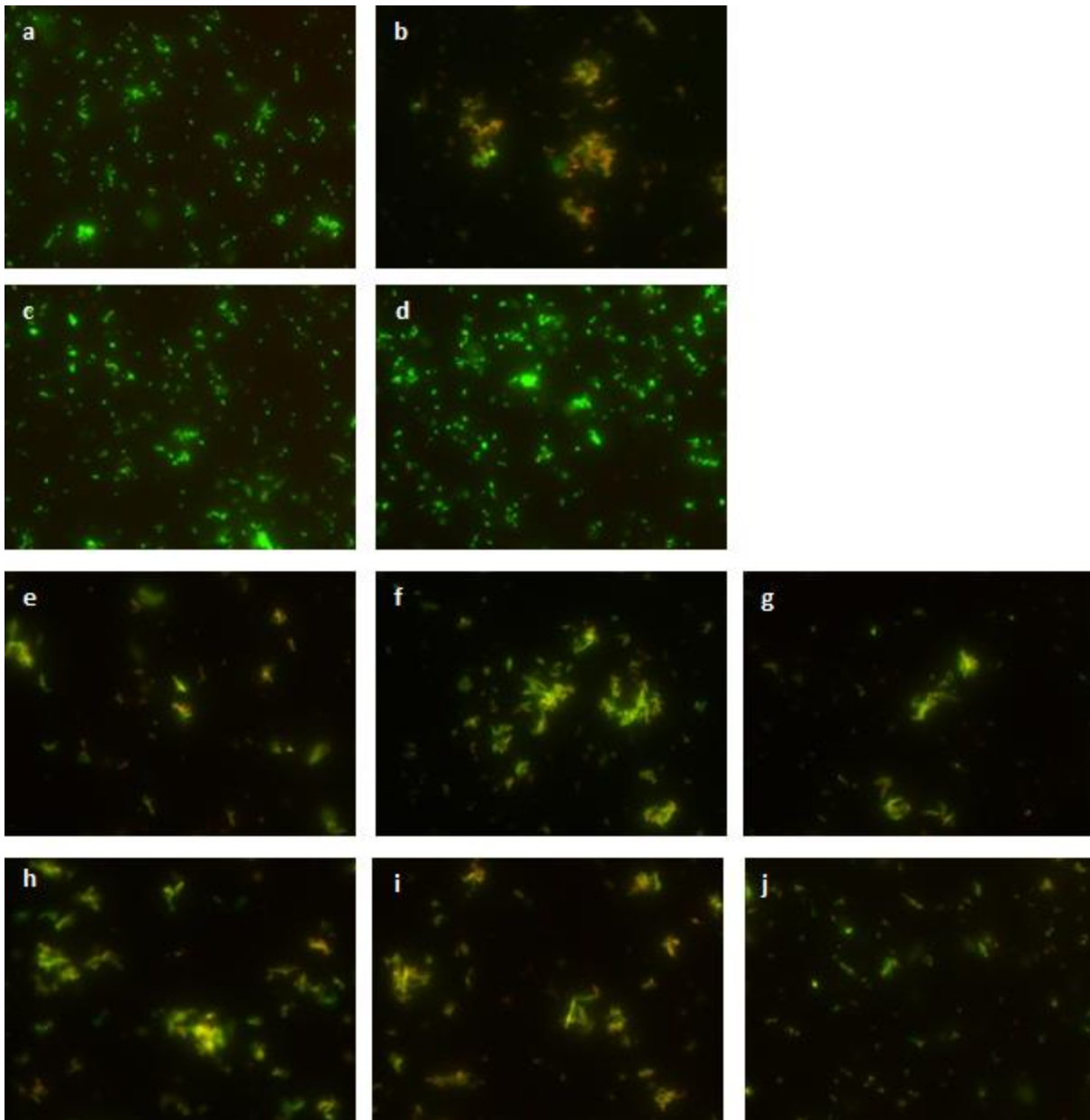


Abbildung 19: BacLight Lebend-Tot-Zelldiskriminierung der *M. fortuitum* Proben

Die Aufnahmen der Kanäle rot und grün wurden wie unter 2.2.8.7. mit einem 40-Fach Objektiv bei 1,3-Fach digitalem Zoom erstellt und wurden dann vor der Überlagerung mit GIMP normalisiert. Unter a – j sind die Überlagerungen des roten und des grünen Kanals gezeigt.

Zellen mit einer intakten Membran sind grün. Bei einer Membranschädigung liegt ein Farbwechsel zu gelb bzw. rot vor.

Lagerungspuffer (Negativkontrolle) (a), 50 μ M Lysozym und 5 μ M Lipase (b), Lysin A TM4gp29-H (c), Artilysin A TM4gp29-H-PK (d), Lysin B D29gp12-H (e), Artilysin B pK34-D29gp12-H (f), Mischung aus TM4gp29-H und D29gp12-H (g), aus TM4gp29-H-PK und D29gp12-H (h), aus TM4gp29-H und pK34-D29gp12-H (i) und aus pK34-TM4gp29-H und pK34-D29gp12-H (j).

3.5.7. Visualisierung des antimykobakteriellen Effektes mittels Transmissions-Elektronen-

Mikroskopie

Um durch eine höhere Auflösung den Effekt der Lysine und Artily sine auf die mykobakteriellen Zellen genauer untersuchen zu können, wurden TEM-Aufnahmen am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg erstellt.

Die *M. smegmatis* SMR5 Zellen wiesen bei der Behandlung mit der Negativkontrolle Lagerungspuffer eine intakte Stäbchen-Morphologie und eine unauffällige Elektronendichte auf, was als der native Zustand bei diesen Bedingungen betrachtet wurde (siehe Abbildung 20 a). Auch bei der in Abbildung 20 b dargestellte Probe Lysin A TM4gp29-H wurde keine Veränderung der Morphologie oder der Elektronendichte beobachtet. Somit zeigten die TEM-Aufnahmen, dass das Lysin A keine erkennbare Schädigung der Zellen erzeugte.

Für die Ansätze Lysin B D29gp12-H und Artily sin B PK-D29gp12-H (siehe Abbildung 20 c und d) wurde hingegen eine stark reduzierte Elektronendichte bei einer größtenteils unveränderten Zellmorphologie beobachtet. Zusätzlich waren kleine Objekte in der Umgebung der Zellen erkennbar, die als zytoplasmische Bestandteile, wie z.B. Ribosomen, interpretiert wurden. Folglich führte die antimykobakterielle Aktivität des Lysins B bzw. des Artily sins B zu einem Verlust von zytoplasmischem Material, einem „Auslaufen“ der Zellen.

Die weitere Untersuchung der Kombination aus Lysin A D29gp10-H und Artily sin B PK-D29gp12-H (siehe Abbildung 20 e) ergab, dass die Zellen keine Stäbchen-Morphologie mehr aufwiesen, sondern fragmentiert wurden und sich Zelltrümmeransammlungen bildeten. Zudem war, wie bei den Lysin B bzw. Artily sin B Proben, auch bei der Mischung die Elektronendichte der verbliebenen Zellen stark reduziert, was den Verlust von zytoplasmischem Material zeigte.

Damit belegten die TEM-Aufnahmen, dass die Mykobakterien durch die Behandlung mit dem Lysin B bzw. Artily sin B nicht lysierten, was an der unveränderten Morphologie erkennbar war. Die antimykobakterielle Aktivität des Lysins B D29gp12-H bzw. Artily sins B PK-D29gp12-H beruhte also vermutlich auf dem beobachteten Verlust an zytoplasmischem Material, der an der reduzierten Elektronendichte und den die Zellen umgebenden Objekte erkennbar war, und der dafür nötigen Destabilisierung der äußeren Strukturen. Zudem zeigten die Ergebnisse der Probe der Mischung aus Lysin A und Artily sin B, dass die enzymatische Aktivität des Lysin A D29gp10-H zu einer zusätzlichen Fragmentierung der *M. smegmatis* SMR5 Zellen führt. Folglich wurde das Peptidoglykan durch die Lysin B Aktivität für das Lysin A zugänglich, was den enzymatischen Abbau des Peptidoglykans und die Fragmentierung der Zellen ermöglichte.

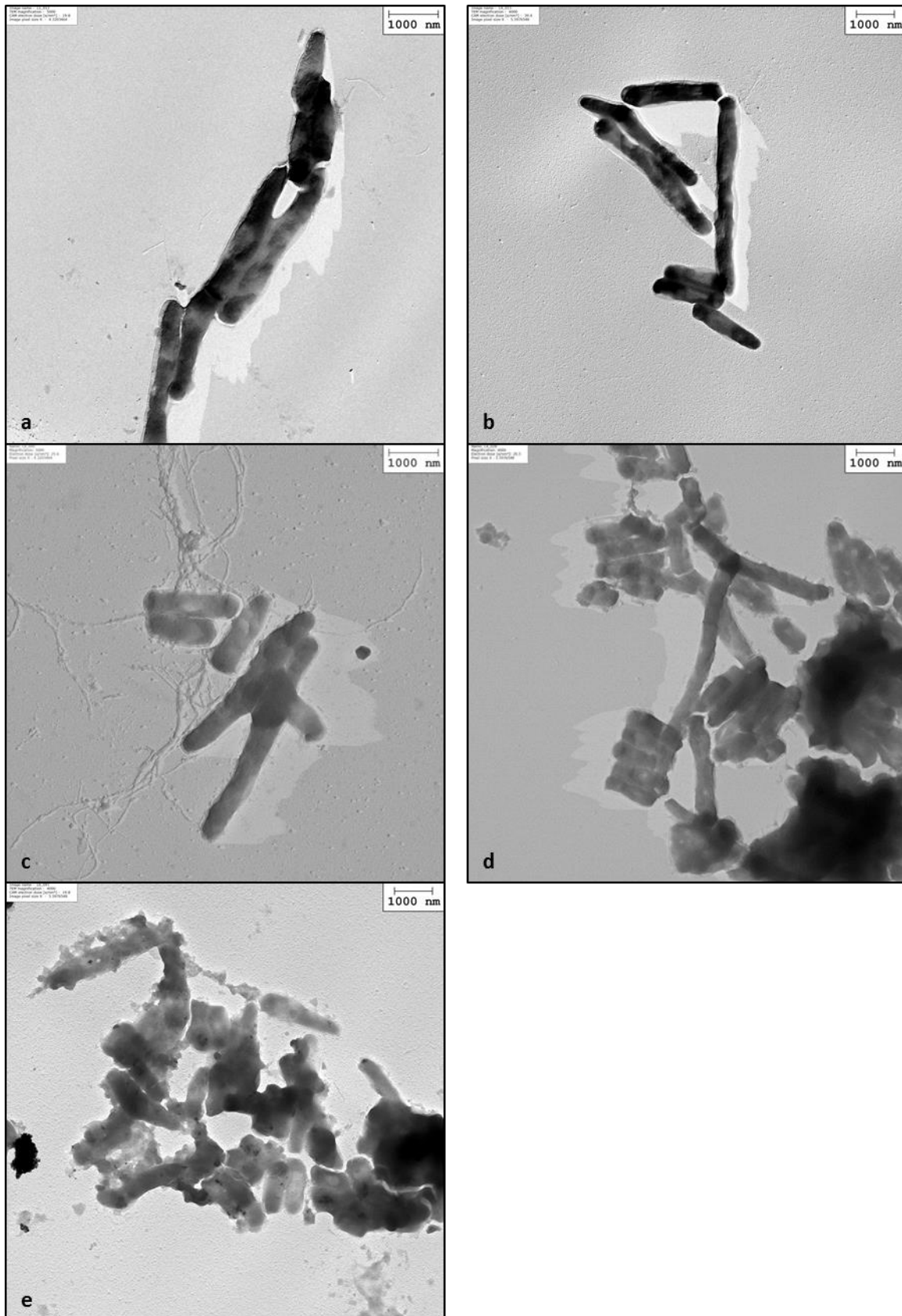


Abbildung 20: Transmissions-Elektronen-Mikroskopie der antimykobakteriellen Wirkung

Die Aufnahmen wurden wie unter 2.2.8.8. beschrieben erstellt und die Farbwerte der Aufnahme c wurden mit GIMP auf ein Vergleichbares Niveau reduziert.

Lagerungspuffer (Negativkontrolle) (a), Lysin A TM4gp29-H (b), Lysin B D29gp12-H (c), Artilysin B PK-D29gp12-H (d) Mischung aus D29gp10-H und PK-D29gp12-H (e).

4. Diskussion

4.1. Endolysine als antibakterielle Wirkstoffe und Auswahl der Lysine

Seit dem Beginn der industriellen Produktion von Antibiotika vor über 60 Jahren sind diese die gängige Therapie bei bakteriellen Infektionen, da sie für eukaryontische Zellen meist nicht schädlich sind und essentielle Komponenten für das Wachstum oder die Lebensfähigkeit der Bakterien als Ziele haben. Jedoch warnte Alexander Fleming bereits in seiner Nobelpreisrede vor der Bildung von Resistenzen bei falscher Anwendung der Antibiotika (Fleming A., 1945). Und in der Tat belegten unter anderem die World Health Organisation in ihrem Bericht *„Antimicrobial resistance: global report on surveillance“*, dass die Zunahme der bakteriellen Resistenzen gegen Antibiotika heutzutage eine enorme medizinische und wirtschaftliche Problematik darstellt und eine sogenannte post-Antibiotika-Ära droht (World Health Organization, 2014). Deswegen werden neue antibakterielle Wirkstoffe benötigt, wobei die Zulassungszahlen neuer Antibiotika in den letzten 30 Jahren stark abgenommen haben und z.B. zwischen 2008 und 2011 nur zwei neue Medikamente zugelassen wurden (z.B. Bassetti M. *et al.*, 2013). Da zudem für die meisten Antibiotika innerhalb weniger Jahre Resistenzen oft bereits vor, oder kurz nach der Markteinführung beobachtet wurden und sich auch durch horizontalen Gentransfer schnell verbreiteten, ist die Entwicklung von alternativen antibakteriellen Wirkstoffen von großer Bedeutung (z.B. Cheng G. *et al.*, 2014 und Penchovsky R. und Traykovska M., 2015).

Ein vielversprechender Ansatz ist dabei die Nutzung der lytischen Proteine von Bakteriophagen, der sogenannten Endolysine. Diese zeigen im Gegensatz zu Antibiotika eine sehr schnelle Abtötung der Zellen durch den enzymatischen Abbau des Peptidoglykans, eine hohe Spezifität und bisher keine Resistenzbildung. Auch die antibakterielle Wirkung *in vivo* konnte bereits für verschiedene Endolysine belegt werden, wobei bisher keine Toxizität auf eukaryontische Zellen und keine die Aktivität neutralisierenden Antikörper beobachtet wurden. Zudem sind Endolysine durch ihre enzymatische Wirkung möglicherweise auch gegen persistierende Zellen wirksam (Fischetti V. A., 2008; Fenton M. *et al.*, 2010; Nelson D. C. *et al.*, 2012; Schmelcher M. *et al.*, 2012; Pastagia M. *et al.*, 2013). Gerade diese sogenannten *Persisters*, die in der Regel ein Bestandteil der bakteriellen Population sind, stellen bei der Therapie mit Antibiotika ein enormes Problem dar (z.B. Cohen N. R. *et al.*, 2013), da diese Zellen in einem Zustand geringer metabolischer Aktivität, minimaler Teilungsrate und erhöhter Resistenz gegen Schadstoffe vorliegen und damit nicht mit Antibiotika behandelbar sind. Zudem konnten Studien belegen, dass die Persistenz durch verschiedenste Umweltfaktoren wie z.B. die Temperatur, das Wachstum in einem Biofilm oder Toxine ausgelöst und durch die Stress-Antwort der Bakterien aktiv aufrechterhalten wird, was eine beschleunigte Resistenzbildung

ermöglichen kann (Cohen N. R. *et al.*, 2013). Auch bei Biofilmen, also Gemeinschaften von Bakterien, umgeben von einer extrazellulären Matrix, sind solche persistierende Zellen vorhanden. Dabei ist der Anteil an *Persisters* in Biofilmen oftmals höher als bei planktonischen Zellen und ist zudem aufgrund der durch die extrazelluläre Matrix veränderten Aufnahme von Molekülen schlechter für Wirkstoffe zugänglich (van Acker H. *et al.*, 2014). Da allerdings für die Mehrheit aller bakteriellen Infektionen vermutet wird, dass sie mit der Biofilmbildung in Zusammenhang stehen (Hall-Stoodley L. *et al.*, 2004), ist gerade die Eliminierung der pathogenen Bakterien im Biofilm für den Therapieerfolg entscheidend. Und auch für diesen wichtigen Aspekt konnte gezeigt werden, dass Endolysine als potentielle Wirkstoffe gut geeignet sind, da z.B. für Cpl-1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine antibakterielle Wirkung auf Streptokokken im Biofilm belegt wurde (Nelson D. C. *et al.*, 2012).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, Lysine aus ausgewählten Mykobakteriophagen zu produzieren und sie auf ihre Eignung für die Entwicklung von antimykobakteriellen Wirkstoffen zu untersuchen. Da davon auszugehen ist, dass das Wirtsspektrum der lytischen Enzyme mindestens so groß ist wie das des Phagen, sind vor allem solche Mykobakteriophagen interessant, die ein breites Spektrum von Mykobakterienarten aus beiden Gruppen, den schnell und den langsam wachsenden Mykobakterien, infizieren können. Da Rybniker J. *et al.* für die Mycobacteriophagen Bxz2, D29, L5 und TM4, zeigen konnten, dass sie ein breites Wirtsspektrum aufweisen und Vertreter von beiden Gruppen infizieren (Rybniker J. *et al.*, 2006), wurden diese Phagen ausgewählt. Für die erfolgreiche Replikation dieser Mykobakteriophagen ist dabei der Abbau des Peptidoglykans durch die Endolysine, die sogenannten Lysine A, eine essentielle Komponente. Allerdings weist das Peptidoglykan der Mykobakterien, abhängig von den Wachstumsbedingungen, den Umwelteinflüssen, der Spezies und des Stammes, unterschiedliche Grade der Modifikationen auf. So wurde bei *M. tuberculosis* eine Zunahme der 3-3-Verbindungen der Peptidstämme in der späten logarithmischen und stationären Wachstumsphase (Lavollay M. *et al.*, 2008; Kieser K. J. and Rubin E. J., 2014) und eine generell dickere Zellwand mit einer dickeren Peptidoglykanschicht bei *extensively drug-resistant (XDR) M. tuberculosis* Stämmen (Velayati A. A. *et al.*, 2009) beobachtet. Auch variierende Grade der N-glycosylierung wurden gezeigt (Mahapatra S. *et al.*, 2005a; Mahapatra S. *et al.*, 2008), wobei die Inhibierung dieser Modifikation zu einer stark erhöhten Sensitivität von *M. smegmatis* gegen Lysozym führte (Raymond J. B. *et al.*, 2005). Zudem wurde für die bisher nur bei pathogenen Mykobakterien beobachtete Einlagerung einer poly-L-Glutaminsäureschicht (Tripathi D. *et al.*, 2013) in die Peptidoglykan-Arabinogalaktanschicht gezeigt, dass sie die peptidoglykanabbauende Aktivität des Lysozyms verringert, was anhand der im Vergleich zu *M. smegmatis* und *M. phlei* deutlich erhöhten Lysozym-Resistenz von *M. bovis* BCG, *M. fortuitum* und *M. tuberculosis* belegt wurde (Kanetsuna F., 1980).

Da die ausgewählten Mykobakteriophagen Bxz2, D29, L5 und TM4 ihren lytischen Replikationszyklus trotz dieser zwischen den Spezies unterschiedlichen Peptidoglykanmodifikationen erfolgreich beenden (Rybniker J. *et al.*, 2006), wurde zudem die Annahme gemacht, dass die Lysine A dieser Phagen solche Unterschiede tolerieren und daher ein breites Aktivitätsspektrum haben. Allerdings kann aus der Lyse durch den Phagen nicht geschlossen werden, ob sich die Effektivität des enzymatischen Abbaus des Peptidoglykans durch das Lysin A ähnlich wie bei der Lysozymtoleranz verändert, da derartige Studien bisher zu fehlen scheinen.

Bei der näheren Betrachtung der Sequenzen und der Domänenstruktur dieser modular aufgebauten Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, L5gp19 und TM4gp29 (siehe Abbildung 21 a) zeigte sich, dass sie, trotz geringer Sequenzidentitäten (siehe Anhang 7), einige Ähnlichkeiten aufweisen. So ist z.B. in allen vier Proteinen die Zellwand-Bindedomäne C1 (CBD) codiert (Payne K. M. and Hatfull G. F., 2012), was den Schluss nahelegt, dass diese Bindedomäne keine hohe Spezifität für eine bestimmte Mykobakterienart aufweist. Auch für die enzymatisch aktive Domäne (EAD) N4 wurde gefolgert, dass diese Domäne eine Aktivität auf ein breites Spektrum von *Mycobacterium*-Spezies aufweist, da bei L5gp10 keine weitere EAD codiert ist.

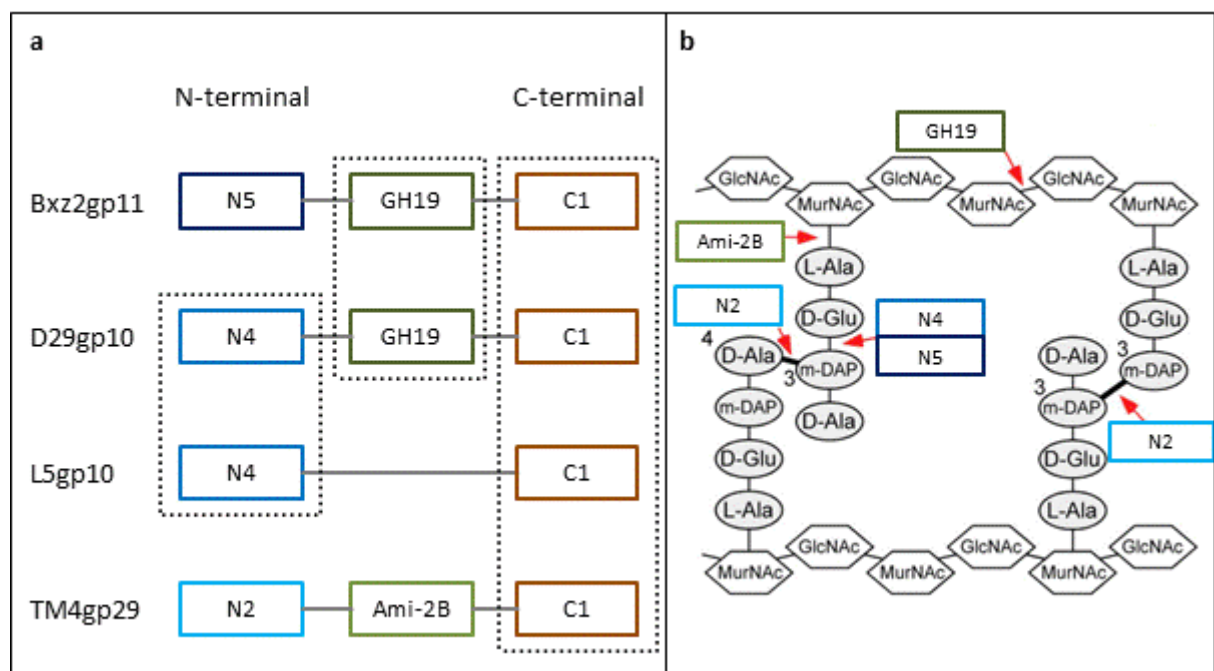


Abbildung 21: (a) Domänenstruktur der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, L5gp10 und TM4gp29; (b) Peptidoglykan-Schnittstellen der enzymatisch aktiven Domänen (EAD) der Lysine A; modifiziert nach Payne K. M. and Hatfull G. F., 2012

Die in (a) dargestellten Domänen N2, N4 und N5 sind Endopeptidasen, GH19 ist eine Muramidase und Ami-2B wird zu den lytischen Transglycosylasen zugeordnet. Die Domäne C1 ist eine Zellwand-Bindedomäne. In der in (b) gezeigten vereinfachten Darstellung des mykobakteriellen Peptidoglykans steht GlcNAc für N-Acetylglucosamin, MurNAc für N-Acetylmuraminsäure, und m-DAP für meso-Diaminopimelinsäure. Die vorhergesagten Schnittstellen sind mit roten Pfeilen angezeigt.

Bei den anderen Lysinen A Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 sind allerdings jeweils zwei EADs codiert und deswegen kann keine Aussage für die einzelnen Domänen getroffen werden, wobei

mindestens eine der EADs ein breites Aktivitätsspektrum aufweisen muss, um die Lyse der Zellen und die Freisetzung der Phagenpartikel zu ermöglichen.

In der lytischen Kasette codieren die meisten Mykobakteriophagen allerdings neben dem Lysin A (Endolysin) ein weiteres Enzym. Dieses sogenannte Lysin B weist eine lipolytische Aktivität auf und spaltet die kovalente Esterbindung zwischen dem Arabinogalaktan und den Mykolsäuren (Gil F. *et al.*, 2008; Gil F. *et al.*, 2010). Damit löst diese Hydrolyse die Mykomembran von der Arabinogalaktanschicht und es wurde von Payne K. *et al.* vermutet, dass dadurch die Fluidität und die Permeabilität der äußeren Membran zunimmt (Payne K. *et al.*, 2009). Zudem hydrolysiert das Lysin B das in der äußeren Membran vorliegende Trehalose-Dimycolat (TDM bzw. *cord factor*), einen Trehalose-Diester aus zwei Mykolsäuren (Gil F. *et al.*, 2010), wobei gezeigt werden konnte, dass eine TDM-Depletion über die Trehalose-Dimycolathydrolase (TDMH), eine Esterase aus *M. smegmatis*, zu einer Lyse der mykobakteriellen Zellen führt (Yang Y. *et al.*, 2013; Atanaskovic I. *et al.*, 2014). Basierend auf diesen Beobachtungen anhand der TDMH vermuteten Yang Y. *et al.* weiterhin, dass die Mykomembran eine essentielle Komponente für die Stabilität und Vitalität der Mykobakterien ist. Daher sind auch die Lysine B als potentielle antimykobakterielle Wirkstoffe oder als Verstärker der Lysin A Wirkung für diese Arbeit von großem Interesse.

Allerdings ist das Lysin B, im Gegensatz zu dem Lysin A, für die Lyse der Wirtszelle nicht essentiell, was für den Mykobakteriophagen Giles auf *M. smegmatis* gezeigt werden konnte (Payne K. *et al.*, 2009). Die Komplementationsversuche mit der Lysin B Deletionsvariante des Phagen Giles belegten jedoch, dass die Effizienz der Mycobacteriophagen-Freisetzung durch das Lysin B deutlich verbessert wurde (Payne K. *et al.*, 2009). Dennoch kann anhand des Wirtsspektrums des Mykobakteriophagen keine generelle Annahme über das Aktivitätsspektrum des Lysins B gemacht werden, da die verschiedenen Spezies unterschiedliche Modifikationen in die Fettsäureketten ihrer Mykolsäuren einführen (Barry C. E., 3rd *et al.*, 1998; Marrakchi H. *et al.*, 2014; Jankute M. *et al.*, 2015). So konnte beispielsweise für die schnell wachsenden Mykobakterien *M. avium* und *M. smegmatis* gezeigt werden, dass der Transmykolat-Anteil und die Länge der Mykolsäureketten bei einer erhöhten Wachstumstemperatur zunimmt, was zu einer Verringerung der Permeabilität der Mykomembran für lipophile Agenzien führt (Liu J. *et al.*, 1996). Für das langsam wachsende Mykobakterium *M. tuberculosis* wurden hingegen Oxygenierungen der Mykolsäuren gezeigt, durch die Keto- bzw. Methoxymykolsäuren erzeugt werden, die die Zelloberfläche hydrophiler machen und dadurch die Permeabilität für hydrophile Substanzen beeinflussen (Barry C. E., 3rd *et al.*, 1998). Zudem weisen die Mykolsäuren verschiedener pathogener Mykobakterien, wie z.B. bei *M. tuberculosis*, Zyklopropanierungen auf, die den Zellen einen Schutz vor oxidativem Stress bieten und zu der Stabilität der Mykomembran beitragen (Takayama K. *et al.*, 2005).

Da diese Modifikationen die biophysikalischen Charakteristika der Mykomembran und der Mykolsäuren ändern, könnten sie die Substratbindung und die enzymatische Aktivität des Lysin B beeinflussen oder verhindern.

Betrachtet man nun die Sequenzidentität (siehe Tabelle 25) und das *Alignment* (siehe Anhang 8) der Aminosäuresequenzen der Lysine B Bxz2gp12, D29gp12, L5gp12 und TM4gp30 im Vergleich zu dem bereits durch Gil F. *et al.* und Grover N. *et al.* ausführlich charakterisierten Lysin B aus dem Mykobakteriophagen Ms6 (Gil F. *et al.*, 2010; Grover N. *et al.*, 2014), ist auffällig, dass Teile der Sequenz hoch konserviert und die Unterschiede zu großen Teilen auf Insertionen zurückzuführen sind. Dennoch sind die Sequenzidentitäten zu gering, um darauf basierend Aussagen über das mögliche Wirtsspektrum treffen zu können.

Prozentuale Sequenzidentität					
Lysin B	Bxz2gp12	D29gp12	L5gp12	Ms6gp3	TM4gp30
Bxz2gp12	100 %	48 %	48 %	34 %	20 %
D29gp12	48 %	100 %	90 %	31 %	18 %
L5gp12	48 %	90 %	100 %	32 %	18 %
Ms6gp3	34 %	31 %	32 %	100 %	23 %
TM4gp30	20 %	18 %	18 %	23 %	100 %

Tabelle 25: Sequenzidentitäten der Lysine B im direkten Vergleich

Jedoch konnten Gil F. *et al.* zeigen, dass das Ms6 Lysin B TDM der Spezies *M. smegmatis*, *M. bovis* und *M. tuberculosis* hydrolysieren kann und damit ein breites Aktivitätsspektrum besitzt, obwohl der Phage Ms6 nicht zu den bekannten Clustern mit einem breiten Wirtsspektrum gehört (Gil F. *et al.*, 2010). Da auch TDM unterschiedliche Modifikationen und Zusammensetzungen bei den verschiedenen Mykobakterienarten aufweist (Fujita Y. *et al.*, 2005) und Rybniker J. *et al.* keine Defizienzen oder Auffälligkeiten bei der Lyse durch die ausgewählten Mykobakteriophagen in ihren Untersuchungen beschrieben, wurde für die Lysine B der Phagen mit einem breiten Wirtsspektrum ein zumindest vergleichbares Aktivitätsspektrum vermutet. Deswegen wurden für diese Arbeit auch die Lysine B der Mykobakteriophagen Bxz2, D29, L5 und TM4 ausgewählt.

4.2. Auswahl der antimikrobiellen Peptide (AMP) für die Entwicklung von Artilyسينen

Die Anwendbarkeit der unmodifizierten Lysine war jedoch unklar, da die Mykomembran (Hoffmann C. *et al.*, 2008) eine mit der äußeren Membran von Gram negativen Organismen vergleichbare Barriere darstellt (Liu J. *et al.*, 1996). So wurde beispielweise für das Lysin A des Phagen Ms6 gezeigt, dass es die Mykomembran bei der Zugabe von außen nicht überwinden kann und dadurch keine antimykobakterielle Wirkung auf die untersuchten *M. smegmatis* bzw.

M. tuberculosis Kulturen aufweist (Mahapatra S. *et al.*, 2013). Auch bei Endolysinen wurde diese Limitierung durch die Barrierefunktion der äußeren Membran beobachtet und es wurden verschiedene Ansätze verwendet, um den Enzymen die Überwindung dieser Barriere zu ermöglichen (z.B. Fischetti V. A., 2008 und Nelson D. C. *et al.*, 2012). Dabei erwiesen sich vor allem die Permeabilisierung der äußeren Membran durch chemische Zusätze wie z.B. EDTA (Vaara M., 1992), die allerdings in einigen Fällen für die *in vivo* Anwendung nicht geeignet ist, oder die Fusion mit Peptiden, die den Transport über die Membran ermöglichen (Briers Y. and Lavigne R., 2015), als vielversprechend. Und in der Tat zeigten Briers Y. *et al.*, dass die Fusionsproteine aus antimikrobiellen Peptiden und Endolysinen, sogenannte Artily sine, die äußere Membran von *P. aeruginosa* überwinden können und dadurch innerhalb von Minuten zu einer Lyse der Zellen führen (Briers Y. *et al.*, 2014b). Zudem konnten nicht nur für Pseudomonaden, sondern auch für weitere Gram negative Organismen wie *Acinetobacter baumannii* wirksame Artily sine erzeugt werden (Daten nicht publiziert), was die breite Anwendbarkeit dieser Technologie belegte.

Daher wurde für diese Arbeit die Fusion der Lysine mit AMPs, also die Erzeugung von Artily sinen, gewählt, um die Überwindung der Mykomembran zu ermöglichen und durch die AMPs potentiell eine zusätzliche antimykobakterielle Aktivität in das Artily sin einzubringen. Dazu wurden jedoch nur Peptide ausgewählt, die keine Cysteine oder Zyklisierungen enthalten und nur aus natürlichen Aminosäuren bestehen, um die Expression der Fusionsproteine in *E. coli* BL21 (DE3) zu ermöglichen und eine mögliche Aggregation zu verringern. Daher wurden die Peptide LL-37, LLKKK-18, und pK34, die aus der Literatur als antimykobakterielle Peptide bekannt sind (Teng T. *et al.*, 2015), und die Peptide PK und SMAP-29, die bei den Artily sinen in der Arbeit von Briers Y. *et al.* gute Ergebnisse zeigten (Briers Y. *et al.*, 2014b), verwendet.

4.3. Expression und Reinigung der Lysine

Für eine mögliche Anwendung der Lysine und Artily sine als antimykobakterielle Wirkstoffe ist die rekombinante Produzierbarkeit von großer Bedeutung. Folglich war die lösliche Expression mit guter Ausbeute eines der Auswahlkriterien für die weitere Bearbeitung. Bei der Reinigung der rekombinant erzeugten Proteine wurde dafür ein solches Protokoll ausgewählt, das aus möglichst wenigen Schritten besteht und dennoch eine, für die nachfolgenden Experimente ausreichende Reinheit des Proteins gewährleistet. Dazu wurde in dieser Arbeit die Proteinreinigung mittels His-Tag Affinitätschromatographie (Schmitt J. *et al.*, 1993) genutzt, da diese Methode in der Regel einen ausreichenden Reinigungseffekt aufweist und relativ robust ist. Die Untersuchung der Ausbeute (siehe 3.1.2.) der mit diesem Protokoll (siehe 2.2.4.) gereinigten Proteine zeigte, dass die Lysine A Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 und das Lysin B D29gp12 mit 18,7, 18,0, 8,7 bzw. 45,8 mg/l gute

lösliche Ausbeuten erreichen und deswegen als Kandidaten geeignet waren. Allerdings war dabei ein großer Teil des exprimierten Proteins (geschätzt circa 30, 60, 50 bzw. 30 %) in der unlöslichen Fraktion des Zellaufschlusses. Außerdem wurde eine starke Aggregationstendenz der Lysine bei Konzentrationen von über 4 mg/ml beobachtet.

Für das Lysin A L5gp10 und die Lysine B Bxz2gp12, L5gp12 und TM4gp30 hingegen war das rekombinant erzeugte Protein hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion (siehe z.B. Bxz2gp12-H in 3.1.2.) und es wurde eine deutlich niedrigere Gesamtexpression beobachtet. Zudem war der Anteil an Proteinkontaminationen im Eluat der Proteinreinigung höher, da eine geringere Absättigung der Säule mit dem rekombinanten Protein zu einer Verstärkung der unspezifischen Bindung von Proteinen an das Affinitätsmaterial führte. Durch diese höhere Verunreinigung konnte die Proteinkonzentration jedoch nicht genau ermittelt werden. Um für diese Proteine dennoch eine Aussage treffen zu können, wurde deswegen der Anteil an Zielprotein über die Bandenstärke auf dem SDS-Polyacrylamidgel abgeschätzt und diese Schätzung als grober Korrekturfaktor für das UV_{280nm} Signal verwendet.

Die Versuche zur Nachreinigung des gut produzierbaren Lysin A Bxz2gp11 über Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (Daten nicht gezeigt) wiesen darauf hin, dass das Protein eine hohe Hydrophobizität aufweist, da es von den verschiedenen HIC Materialien nicht eluiert werden konnte. Daher wurde vermutet, dass die hohe Oberflächenhydrophobizität zu der starken Aggregationstendenz von Bxz2gp11 beiträgt. Betrachtet man allerdings den natürlichen Kontext dieses Enzyms, ist diese Hydrophobizität möglicherweise von Vorteil, da sie den für die Lyse der Wirtszelle essentiellen Transport über die Zytoplasmamembran erleichtern könnte. Diese Vermutung wurde zudem von den Beobachtungen von Payne K. M. und Hatfull G. F. gestützt, dass die Lysine A D29gp10 und L5gp10 die innere Membran von *M. smegmatis* ohne ein Holin überwinden können und bei der Expression zu einer Lyse der mykobakteriellen Zellen führen (Payne K. M. and Hatfull G. F., 2012). Daher wurde auch für die bei den Lysinen A D29gp10 und TM4gp29 beobachtete, vergleichbare Neigung zur Aggregation angenommen, dass bei diesen Proteinen eine hohe Hydrophobizität an der Proteinoberfläche vorliegt. Diese Oberflächenhydrophobizität ist möglicherweise für die Aktivität von Vorteil, da sie zu einer verbesserten Überwindung der zumindest partiell stark hydrophoben Mykomembran (Zuber B. *et al.*, 2008) führen könnte.

Auch die Betrachtung der Oberfläche der Kristallstruktur des Lysin B D29gp12 (siehe Abbildung 22) zeigte einen großen Anteil an stark hydrophoben Bereichen. Da dieses Enzym ebenso wie das Lysin A vom Zytoplasma zur Zellwand transportiert werden muss, wurde dieselbe Annahme gemacht, dass die Oberflächenhydrophobizität diesen Transport über die innere Membran erleichtert. Zudem bilden die Mykolsäuren des Substrates einen Großteil der inneren Schicht der Mykomembran und sind damit, im Gegensatz zu dem Peptidoglykan, in einer stark hydrophoben Umgebung. Daher

könnte eine hohe Oberflächenhydrophobizität des Lysins B für eine Einlagerung in die Mykomembran und die optimale Bindung des stark hydrophoben Substrates und somit für eine effiziente Spaltung vorteilhaft sein. Auch für die Hydrolyse des TDM muss das Lysin B eine Komponente der Mykomembran binden und hydrolysieren, was die Annahme unterstützt, dass die Oberflächenhydrophobizität die partielle Einlagerung dieses Enzyms in die Mykomembran erleichtert oder ermöglicht.

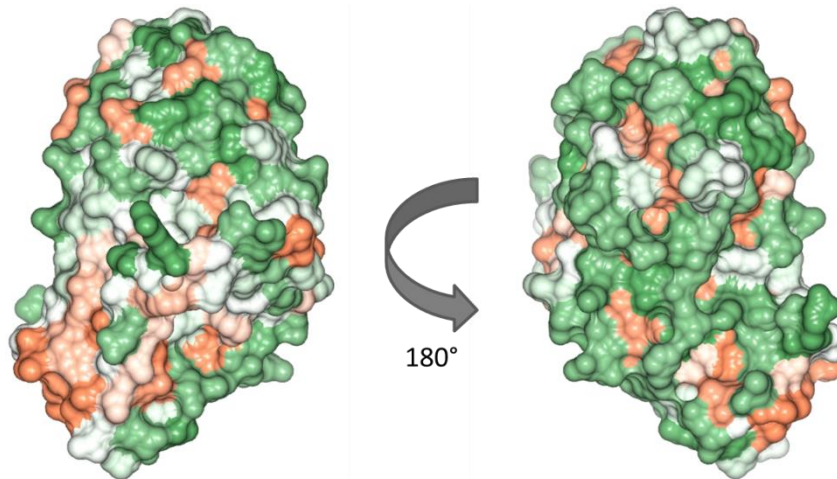


Abbildung 22: Darstellung der Hydrophobizität und Hydrophilie auf der Oberfläche des Lysin B D29gp12

In der Graphik ist die Kristallstruktur des Lysin B D29gp12 (PDB: 3HC7; (Payne K. *et al.*, 2009)) dargestellt. Die hydrophoben Bereiche (Grün) sind gegen die hydrophilen Bereiche (Orange) als Übergang von Grün zu Orange wiedergegeben.

Diese Vermutung konnte für andere Lysine B nicht überprüft werden, da die Kristallstrukturen nicht verfügbar sind. Dennoch wurde angenommen, dass die Aggregationstendenz bei der rekombinanten Produktion der Lysine B wie bei den Lysinen A zumindest teilweise auf der hohen Hydrophobizität der Oberfläche basiert.

Um zu untersuchen, ob die geringen löslichen Ausbeuten durch eine Änderung der Pufferbedingungen bei dem Zellaufschluss und der Proteinreinigung verbessert werden können, wurden mit den Lysinen, die gute lösliche Expressionsausbeuten aufwiesen, *Fluorescence-Thermal-Shift-Assays* durchgeführt, um optimale Pufferbedingungen zu finden. Die Untersuchung wurde dabei in zwei Teile getrennt, die Untersuchung des Puffersystems und des pH-Wertes, sowie die Bestimmung des Einflusses der Natriumchloridmolarität. Die Ergebnisse der Untersuchung des Puffersystems zeigten dabei, dass Bxz2gp11, TM4gp29 und D29gp12 von einem Wechsel des Puffersystems von TRIS pH 8 zu HEPES pH 7,4 profitierten und um 2, 6 bzw 2 °C erhöhte Schmelzpunkte aufwiesen, während D29gp10 keine Veränderung des Schmelzpunktes zeigte. Daher wurde das Puffersystem für alle Reinigungs- und Lagerungspuffer zu 20 mM HEPES pH 7,4 geändert. Die Untersuchung des Einflusses von 0 mM bis 500 mM NaCl hingegen ergab nur für TM4gp29 eine Verbesserung bei steigender Natriumchloridmolarität. Für Bxz2gp11 und D29gp12 wurde kein Effekt beobachtet und für D29gp10 zeigten die Ergebnisse starke Schwankungen, so dass für dieses Protein

keine klare Aussage möglich war. Deswegen wurden die bis dahin verwendeten 500mM NaCl in allen Puffern beibehalten. Diese Optimierungen lieferten zwar eine Verbesserung der löslichen Ausbeute, jedoch war für die Lysine Bxz2gp11, D29gp10 und gp12 und TM4gp29 weiterhin ein großer Teil des rekombinant exprimierten Proteins (bis circa 60 %) in der unlöslichen Fraktion. Auch für die Lysine mit den niedrigen löslichen Ausbeuten wurden Verbesserungen erhalten, wobei Bxz2gp12, L5gp10 und gp12 und TM4gp30 weiterhin hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion vorlagen. Deswegen wurde aus den Ergebnissen geschlossen, dass die Optimierung des Puffersystems im Prinzip erfolgreich war, jedoch weitere Parameter untersucht werden müssten, um potentiell bessere Systeme für die Lysine Bxz2gp12, L5gp10 und gp12 und TM4gp30 zu erhalten.

Neben dem Einfluss des Puffers auf die lösliche Expressionsausbeute wurde bei den hergestellten Artilysinen beobachtet, dass die Fusionen mit den Peptiden LL-37, LLKKK-18 und SMAP-29 neben einer minimalen Ausbeute auch eine erhöhte Aggregationstendenz und teilweise eine erhöhte Lyse der *E. coli* Expressionskulturen zeigten. Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, dass die Proteine durch die Fusion mit den antimikrobiellen Peptiden neben der verstärkten Aggregation auch eine erhöhte Toxizität auf die Expressionszellen aufwiesen, was auch durch die unveränderte Expressionsausbeute der Thioredoxin Fusionsvariante von TRX-D29gp12-H-SMAP-29 gestützt wurde. Bei den Fusionen mit den Peptiden PK und pK34 hingegen war dieser Effekt deutlich schwächer und es wurde eine, mit dem unmodifizierten Protein vergleichbare bzw. nur geringfügig reduzierte lösliche Expressionsausbeute erhalten. Zudem zeigten die nanoDSF Experimente (siehe 3.2.6.), dass die Fusion mit dem Peptid pK34 das Protein D29gp12 thermisch nicht destabilisierte. Daraus wurde gefolgert, dass bei den Artilysinen mit den Peptiden pK34 oder PK der Effekt der höheren Zelltoxizität überwiegt.

4.4. *in vitro* Aktivitätsbestimmung und Charakterisierung

Um die erzeugten Lysine untereinander vergleichen zu können und den Einfluss der Peptide auf die Aktivität schnell testen zu können, ist die Bestimmung der *in vitro* Aktivität ein übliches Vorgehen. Für Endolysine sind in der Literatur verschiedenste Methoden bekannt, um die enzymatische Aktivität zu untersuchen (z.B. Nelson D. C. *et al.*, 2012 und Schmelcher M. *et al.*, 2012). Eine der gängigen Methoden für den Nachweis der *in vitro* Aktivität ist dabei der turbidimetrische Test beziehungsweise der *turbidity reduction assay*. Bei dieser Methode werden intakte Bakterienzellen als Substrat verwendet und mit den Endolysinen inkubiert, was bei lytischer Aktivität zu einer Reduktion der optischen Dichte führt. Um auch Gram negative Zellen verwenden zu können, wurden variierende Protokolle für die Ablösung der äußeren Membran, wie z.B. die Entfernung durch eine Chloroformbehandlung (Jensen H. B. and Kleppe K., 1972) für verschiedene Spezies etabliert. Im

Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch versucht, diese Methodik auf Mykobakterien zu übertragen. Die Experimente zeigten dabei, dass die klassische Chloroformbehandlung wie erwartet für Mykobakterien nicht geeignet ist und zu der Bildung von großen Zellklumpen führt, da vermutlich nur die freien Lipide extrahiert werden. Um diese Problematik zu lösen, wurden die mykobakteriellen Zellen mit Lipase bzw. mit Lysin B behandelt, um die kovalente Bindung zwischen dem Peptidoglykan und den Mykolsäuren der äußeren Membran zu spalten. Dieser Ansatz erwies sich jedoch ebenfalls als nicht geeignet, da keine Bedingungen gefunden werden konnten, die das Peptidoglykan für Lysin A zugänglich machten und nicht zu einer vollständigen Verklumpung der Zellen führten. Um die *in vitro* Aktivität dennoch bestimmen zu können, wurde eine Adaption des von Henry M. *et al.* für Lysin A TM4gp29 beschriebenen Chloroform-Tests auf *E. coli* etabliert. Bei dieser Methode wird das zu testende Lysin A rekombinant in *E. coli* exprimiert und das Peptidoglykan dann durch die Zugabe von 2 % Chloroform zugänglich gemacht (Henry M. *et al.*, 2010). Um diese Methode schonender für die Expressionszellen durchzuführen, wurde in dieser Arbeit allerdings Chloroform-gesättigtes LB-Medium anstatt einer zweiprozentigen Chloroformlösung verwendet. Dadurch konnte die Reduktion der optischen Dichte durch den Chloroform-Effekt verringert, jedoch nicht eliminiert werden. Zudem wurden Schwankungen der in der Zelle vorliegenden Lysinmenge beobachtet, was anhand der zur Kontrolle durchgeführten SDS-Polyacrylamid-Gele erkennbar war. Da die optische Dichte der Zellen für den Expressionsbeginn und den Testbeginn bei allen Ansätzen auf denselben Wert eingestellt wurde, legte die Beobachtung den Schluss nahe, dass diese Unterschiede durch die eigentliche Expressionsrate der verschiedenen Lysine A entstanden. Diese beiden Fehlerquellen konnten jedoch nicht beseitigt werden und hatten einen großen Anteil an der beobachteten hohen Standardabweichung (siehe 3.3.1.). Daher wurden mit diesen Experimenten generell nur Trends bestimmt und qualitative Aussagen gemacht. Für D29gp10 wurde dabei keine Aktivität beobachtet, während D29gp10ΔCBD eine gute Aktivität zeigte. Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtungen von Pohane A. A. *et al.*, die zeigen konnten, dass die D29gp10 EADs das A1γ Peptidoglykan von *E. coli* spalten können, jedoch durch eine intramolekulare Interaktion mit der CBD inhibiert werden, was die Selektivität für das modifizierte A1γ Peptidoglykan der Mykobakterien erzeugt und eine regulatorische Funktion haben könnte (Pohane A. A. *et al.*, 2014).

Auch für weitere Endolysine wie z.B. CD27L aus dem Phagen φCD27 konnte ein Einfluss von intramolekularen Interaktionen der einzelnen Domänen auf die antibakterielle Aktivität gezeigt werden (Mayer M. J. *et al.*, 2011). Zudem belegten Untersuchungen mit verschiedenen modularen Endolysinen wie z.B. CD27L, PlyTW oder PlyGBS, dass eine erhöhte antibakterielle Aktivität bzw. ein erweitertes Aktivitätsspektrum durch die Deletion oder den Austausch von Domänen der Lysine erzeugt werden kann (Loessner M. J. *et al.*, 1998; Low L. Y. *et al.*, 2005; Cheng Q. and Fischetti V.,

2007; Fenton M. *et al.*, 2010; Low L. Y. *et al.*, 2011; Mayer M. J. *et al.*, 2011; Schmelcher M. *et al.*, 2012).

Daher wurden, um auch bei den Lysinen A Bxz2gp11 und TM4gp29 einen möglichen Einfluss der CBD auf die *in vitro* Aktivität zu überprüfen, CBD Deletionsvarianten (Δ CBD) erstellt und in dem Chloroform-Test untersucht. Bxz2gp11 zeigte dabei sowohl in der Volllänge als auch in der Deletionsvariante eine Aktivität auf das *E. coli* Peptidoglykan, wobei Bxz2gp11 Δ CBD eine geringfügig höhere Reduktion der optischen Dichte aufwies. Die CBD Deletion führte allerdings auch zu einer höheren löslichen Expression, was vermuten lässt, dass die Deletion der CBD keinen Effekt auf die *in vitro* Aktivität von Bxz2gp11 hat. Für TM4gp29 hingegen zeigte das Volllängen-Lysin, wie anhand der Ergebnisse von Henry M. *et al.* erwartet, eine OD-Reduktion (Henry M. *et al.*, 2010), während die Δ CBD Variante keine *in vitro* Aktivität mehr aufwies. Um nun zu prüfen, ob dieser Aktivitätsverlust durch einen Verlust der Proteinstruktur verursacht wird, wurden die CD-Spektren der beiden TM4gp29 Varianten analysiert. Die Messungen zeigten aber, dass beide Proteine nativ oder zumindest nativ-ähnlich gefaltet waren. Ein kompletter Strukturverlust als Ursache für die fehlende enzymatische Aktivität konnte daher ausgeschlossen werden. Zudem war die lösliche Expressionsausbeute und die Expressionsrate der beiden Varianten vergleichbar hoch, was den Aktivitätsverlust durch eine verringerte Löslichkeit der Deletionsvariante ausschloss. Die Ergebnisse zeigten daher die Notwendigkeit der Zellwand-Bindedomäne für die TM4gp29 Aktivität auf das Peptidoglykan von *E. coli*. Diese Beobachtung entsprach damit dem auch für andere Endolysine, wie z.B. Ply118 und Ply500 (Loessner M. J. *et al.*, 2002), gezeigten Effekt, dass die CBD vermittelte Bindung des Endolysins an das Peptidoglykan die Hydrolyse durch die EADs verbessert oder ermöglicht, was beispielsweise durch eine niedrige Affinität der EADs für das Substrat begründet sein kann (Fenton M. *et al.*, 2010; Schmelcher M. *et al.*, 2012).

Allerdings wurde die Reduktion der Aktivität von TM4gp29 Δ CBD auf *E. coli* Peptidoglykan beobachtet und deswegen konnte keine eindeutige Aussage über einen möglichen Effekt bei der Lyse von mykobakteriellen Zellen gemacht werden. Dennoch wurde das Volllängen-Lysin A TM4gp29 für die weiteren Tests ausgewählt, um einen potentiellen Aktivitätsverlust durch die CBD Deletion zu vermeiden. Auch für die Lysine A von Bxz2gp11 und D29gp10 wurden die Volllängenproteine verwendet, da bei Bxz2gp11 auf *E. coli* kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten beobachtet wurde und für D29gp10 bekannt ist, dass die intramolekulare Interaktion der EADs mit der CBD die Aktivität auf Peptidoglykan von Mykobakterien nicht inhibiert (Pohane A. A. *et al.*, 2014). Für die Bestimmung der *in vitro* Aktivität der Lysine B hingegen wurde die Esterase-Aktivität anhand des Umsatzes des chemischen Substrates 4-Nitrophenylacetat in einem von Gilham D. und Lehner R., 2005 abgewandelten Protokoll untersucht (siehe 2.2.7.2.). Dabei wird durch die Spaltung einer Esterbindung der Farbstoff p-Nitrophenol freigesetzt und diese Reaktion durch eine Veränderung der

Absorption bei 420 nm detektiert (Gilham D. and Lehner R., 2005). Während die Methode nur eine geringe Standardabweichung erzeugte (siehe 3.3.1.), entstand dennoch durch die Ungenauigkeit der Konzentrationsbestimmung der Lysine B Bxz2gp12, L5gp12 und TM4gp30 (siehe 4.3.) ein nicht bestimmbarer Fehler. Deswegen wurden basierend auf der Absorptionsveränderung nur qualitative Aussagen getroffen und nur die linearen Bereiche der Umsatzkurven bei dreitausendfachem Substratüberschuss verwendet. Die Ergebnisse zeigten dabei, dass alle vier Lysine B eine Esterase-Aktivität aufwiesen, und dass der Substratumsatz von Bxz2gp12 deutlich höher als bei den anderen drei Proteinen war, die vergleichbare *in vitro* Aktivitäten zeigten.

Da D29gp12, im Gegensatz zu modularen Endolysinen, für die der Austausch oder das Einfügen einzelner Module oftmals keinen Struktur- oder Funktionsverlust zur Folge hat (Donovan D. M. *et al.*, 2006; Schmelcher M. *et al.*, 2011; Schmelcher M. *et al.*, 2012), eine globuläre Proteinstruktur aufweist, wurde auch die Modifizierbarkeit der beiden Termini der Lysine B mit dieser Methode untersucht. Allerdings sind die Termini von globulären Proteinen meist an der Proteinoberfläche zu finden, oder zumindest lösungsmittelzugänglich (Jacob E. and Unger R., 2007), was die Fusion mit den AMPs nicht prinzipiell ausschließt. Die Untersuchung der Lysine B Bxz2gp12, L5gp12 und TM4gp30 ergab dabei einen, in Anbetracht der unpräzisen Konzentrationsbestimmung, zu geringen Unterschied des Substratumsatzes zwischen der Variante mit dem N- und der mit dem C-terminalen His-Tag, um eine Aussage treffen zu können. Für D29gp12 konnte hingegen der Einfluss der Position des His-Tags untersucht werden und die Experimente zeigten, dass der Substratumsatz der Varianten mit dem C-terminalen Tag um circa Faktor 1,4 also geringfügig höher ausfiel. Damit belegten die Ergebnisse, dass beide Termini der Lysine B prinzipiell mit der Fusion an Peptide, in diesem Fall dem 6-Histidin Tag, modifiziert werden können, ohne zu einem direkten Aktivitäts- oder Strukturverlust des Proteins zu führen.

Um weiterhin den Effekt der Fusion mit den AMPs zu untersuchen, wurde die *in vitro* Aktivität der auf Bxz2gp12 und D29gp12 basierenden Artily sine B bestimmt (siehe 3.3.3.). Allerdings lag bei den C-terminalen Fusionsproteinen durch den His-Tag eine Verbindungssequenz bzw. ein Linker vor, weswegen die Ergebnisse der beiden Termini nicht direkt vergleichbar waren. Dennoch zeigten die für Bxz2gp12-H und die Fusionen mit dem PK Peptid erhaltenen, im Rahmen des durch die unpräzise Konzentrationsbestimmung bedingten Fehlers vergleichbaren enzymatische Umsatzraten, dass die Fusion dieses AMP bei beiden Termini keinen Effekt auf die *in vitro* Aktivität aufwies. Auch die Fusionen von D29gp12-H mit dem PK Peptid und dem pK34 Peptid ergaben mit dem unmodifizierten Lysin B vergleichbare *in vitro* Aktivitäten. Die Artily sine B aus D29gp12-H und den Peptiden LL-37 bzw. SMAP-29 wiesen jedoch reduzierte Umsatzraten auf, wobei aufgrund des Fehlers bei der Proteinkonzentrationsbestimmung keine klare Aussage über den Effekt der Peptide LL-37 und SMAP-29 auf die *in vitro* Aktivität möglich war. Damit belegten die Ergebnisse, dass die

Lysine B Bxz2gp12 und D29gp12 an beiden Termini mit Fusionen an Peptide ohne Aktivitätsverlust modifiziert werden können und für die Erzeugung von Artilysinen geeignet sind.

Neben dem Einfluss der Fusion mit den AMPs wurde auch untersucht, wie der pH-Wert und die verwendete Natriumchloridmolarität den Substratumsatz der Lysine B beeinflussen. Da für D29gp12 bereits gezeigt war, dass das Optimum für die Hydrolyse von 4-Nitrophenylbutyrat im leicht basischen liegt (Hou L. *et al.*, 2010) und auch MS6gp3 ein Optimum im leicht basischen aufweist (Gil F. *et al.*, 2008), wurde in dieser Arbeit ein pH-Bereich von pH6 bis pH9 gewählt. Für die Untersuchung dieses pH-Bereiches waren jedoch verschiedene überlappend gewählte komplexe Puffersysteme nötig, um einen möglichen Puffereffekt zu bestimmen. Da zudem bekannt ist, dass 4-Nitrophenylacetat bei einem basischem pH-Wert einen schnelleren thermischen Zerfall zeigt, wurde dieser bei allen Bedingungen ermittelt und als Korrekturfaktor für die erhaltenen Umsatzraten verwendet. Die Ergebnisse zeigten dabei (siehe 3.3.2.), dass das Optimum aller vier Lysine B im basischen pH-Bereich lag, wobei Bxz2gp12, D29gp12 und L5gp12 bei pH8 und TM4gp30 bei pH9 den höchsten Substratumsatz aufwiesen. Daher wurde gefolgert, dass für die enzymatische Aktivität der Lysine B erwartungsgemäß ein leicht basischer pH ideal ist. Zudem lag kein Einfluss des verwendeten Puffers und der Natriumchloridmolarität vor, da nur geringe, nicht signifikante Unterschiede des Substratumsatzes beobachtet wurden. Die Ergebnisse der *in vitro* Aktivitätsbestimmungen der Lysine B legten also den Schluss nahe, dass der gewählte pH-Wert von 7,4 und die Natriumchloridmolarität von 500 mM für die Bestimmung der antimykobakteriellen Aktivität gut geeignet waren.

Bei den Experimenten mit den ausgewählten Lysinen B Bxz2gp12 und D29gp12 zeigte sich jedoch, dass die *in vitro* Aktivität bei der Lagerung in 20 mM HEPES pH 7,4 (NaOH), 500 mM NaCl sehr schnell abnahm und bereits nach 21 Tagen bei 4 °C circa 70 % bzw. circa 40 % Aktivitätsverlust beobachtet wurden (siehe 3.2.4.2.). Für die potentielle Nutzung der Lysine als antimykobakterielle Wirkstoffe ist allerdings eine Lagerungsstabilität von zumindest mehreren Monaten notwendig, da eine Anwendung sonst nicht wirtschaftlich sinnvoll ist. Daher wurde ein Lagerungsexperiment mit den beiden Lysinen B durchgeführt, wobei zum einen die Variation von zwei Pufferzusätzen (NaCl und Glycerin) und zum anderen eine andere Lagerungstemperatur (-20 °C) bezüglich ihres Einflusses auf den *in vitro* Aktivitätsverlust überprüft wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe von 30 % Glycerin bei beiden Proteinen zu einer Reduktion des lagerungsbedingten Aktivitätsverlustes führte, wobei diese bei der Lagerung bei -20 °C ihren positiven Effekt verlor, was auf die wiederholte Erwärmung auf RT und anschließende Abkühlung auf -20 °C zurückgeführt wurde. Für D29gp12 wurde zudem beobachtet, dass auch die Reduktion der Natriumchloridmenge auf 250 mM eine deutliche Verbesserung der Lagerungsstabilität bewirkte, die sogar geringfügig höher als bei der Zugabe von Glycerin war. Um für alle Proteine denselben Lagerungspuffer zu verwenden wurde die

Lagerung mit 30 % Glycerin bei 4 - 8 °C gewählt, welche den Aktivitätsverlust nach 55 Tagen auf circa 40 % bzw. circa 30 % reduzierte. Damit zeigten die Ergebnisse, dass die Optimierung des Lagerungspuffers und damit der Formulierung prinzipiell erfolgreich war und eine für diese Arbeit geeignete Lagerungsbedingung identifiziert wurde. Jedoch konnte keine für eine Anwendung als Produkt ausreichende Lagerungsstabilität erreicht werden, da weiterhin ein Aktivitätsverlust nach weniger als zwei Monaten beobachtet wurde. Daher wären ausführlichere Formulierungs- und Lagerungsuntersuchungen notwendig, um für potentielle Wirkstoff-Kandidaten optimale Lagerungsbedingungen zu finden. Dafür könnte auch die Lyophilisierung des Proteins eine praktikable Lösung darstellen, sofern sich Bedingungen identifizieren lassen, die eine Resuspension ohne eine Reduktion der antimykobakteriellen Aktivität erlauben.

Nach der Bestimmung der *in vitro* Aktivität wurde der Oligomerisierungszustand der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, TM4gp29, der darauf basierenden CBD Deletionsvarianten und des Lysins B D29gp12 untersucht (siehe 3.2.3.). Die Bildung von spezifischen Oligomeren über intermolekulare Interaktionen ist für verschiedene Endolysine beschrieben, wie z.B. die Dimerisierung von CD27L des *Clostridium*-Bakteriophagen Φ CD27 (Dunne M. *et al.*, 2014), und auch für die hier untersuchten Lysine vorstellbar. Lysin A Bxz2gp11 ergab dabei bei einer physiologischen Natriumchloridkonzentration (150 mM) hauptsächlich einen oligomeren Zustand, der anhand des Retentionsvolumens auf ein mögliches Trimer hinwies, mit einer Schulter des *Peaks*, die einen kleinen Anteil an monomerem Protein anzeigte. Auch für D29gp10 wurde ein *Peak* mit einer Schulter beobachtet, wobei das erhaltene Molekulargewicht ein mögliches Dimer für den Haupt-*Peak* und ein Monomer für die Schulter ergab. TM4gp29 wies hingegen keine Schulter auf und lag damit nur als Oligomer vor, wobei das Retentionsvolumen ein mögliches Tetramer anzeigte. Zudem wiesen Bxz2gp11 und TM4gp29 einen *Peak* im Ausschlussvolumen auf, der die Bildung von sehr großen Komplexen (≥ 2000 Da) anzeigte, die als Aggregate interpretiert wurden. Die Läufe der CBD Deletionsvarianten dieser Lysine A ergaben hingegen Retentionsvolumen, die einen monomeren Zustand entsprachen, wobei die Schulter bei der Messung von D29gp10 Δ CBD auf einen möglichen Abbau hinweisen könnte. Im Vergleich erzeugte die Deletion der CBD also eine Eliminierung der Bildung der Oligomere. Diese Beobachtung legte den Schluss nahe, dass die Oligomerisierung der drei Lysine A und die Aggregation von Bxz2gp11 und TM4gp29 durch die Zellwand-Bindedomäne vermittelt wurden.

Der molekulare Hintergrund dieses Effektes war jedoch unklar. Dabei wären definierte Interaktionen der CBD für die Bildung eines spezifischen Oligomerzustandes, wie sie z.B. für das Dimer des Endolysin CD27L gezeigt wurden (Dunne M. *et al.*, 2014), denkbar. Zudem könnte die mögliche Oligomerisierung eine regulatorische Funktion haben, wie sie z.B. für die Dimerisierung von Clp-1 (Monterroso B. *et al.*, 2008) und für die Dimerisierung von CD27L vermutet wird (Dunne M. *et al.*,

2014). Jedoch wäre auch eine unspezifische Interaktion der CBDs über Peptidoglykanfragmente der für die Expression verwendeten *E. coli* Zellen möglich. Diese Fragmente könnten dabei von mehreren CBDs gebunden werden und dadurch zu einer Oligomerisierung führen, da bereits für verschiedene Bakterienarten gezeigt werden konnte, dass die CBDs von Endolysinen eine starke Bindung an geeignetes Peptidoglykan aufweisen (Kretzer J. W. *et al.*, 2007). Allerdings vermuteten Pohane A. A. *et al.*, dass die Aktivität von D29gp10 aufgrund der geringeren Affinität der CBD für das *E. coli* Peptidoglykan durch die Interaktion der EADs mit der CBD inhibiert wird (Pohane A. A. *et al.*, 2014). Somit ist die Oligomerbildung über die *E. coli* Peptidoglykanfragmente für D29gp10 eher unwahrscheinlich und basiert vermutlich auf einem anderen Effekt. Im Gegensatz zu den Lysinen A ergab das Lysin B D29gp12 nur einen *Peak*, der durch das errechnete Molekulargewicht einen monomeren Zustand anzeigte.

Vermutet werden könnte auch eine Interaktion zwischen Lysin A und Lysin B, da beide Proteine zum selben Zeitpunkt im lytischen Zyklus benötigt werden und die Zytoplasmamembran überwinden müssen. Der Vergleich der erhaltenen Gelfiltrationschromatogramme der 1 : 1 Mischung zeigte allerdings, dass der Haupt-*Peak* des Lysin A D29gp10 und der *Peak* des Lysin B D29gp12 zwischen den Einzelläufen und dem Lauf der 1 : 1 Mischung identisch waren. Nur die Signalintensität der Schulter von D29gp10, die dem Monomer entspricht, war in der Mischung erhöht. Da jedoch keine weiteren Veränderungen im Vergleich der Chromatogramme erkennbar waren, wurde postuliert, dass unter diesen Bedingungen keine Interaktion von Lysin A mit Lysin B vorliegt.

4.5. Mutagenese für die thermische Stabilisierung von D29gp12

Die thermische Stabilität ist bei der Entwicklung von antimykobakteriellen Wirkstoffen von großer Bedeutung, da sowohl die potentiell erhöhte Körpertemperatur des Patienten, als auch die bei der Großproduktion und Lagerung vorliegenden Temperaturen keinen Aktivitätsverlust erzeugen dürfen. Um die thermische Stabilität des Proteins zu steigern gibt es verschiedene Ansätze, wobei die Optimierung der Formulierung und die Modifikation des Proteins die gängigsten sind. In dieser Arbeit konnte dabei gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Schmelzpunktes durch Optimierung des Puffersystems und der Zusätze prinzipiell erreicht werden kann (siehe 4.4.). Eine weitere Verbesserung der thermischen Stabilität nach der optimierten Formulierung ist nur durch eine Modifikation des Proteins durch Mutagenese möglich. Dafür werden mit verschiedenen Methoden Residuen des Proteins identifiziert, deren Austausch zu einer Verbesserung der thermischen Stabilität führt, ohne einen Verlust der enzymatischen Aktivität zu erzeugen. Hierzu wurde exemplarisch das Lysin B D29gp12 ausgewählt, da es aufgrund der hohen löslichen Ausbeute (über 40 mg/l) und der verfügbaren Kristallstruktur (Payne K. *et al.*, 2009) sehr gut geeignet war.

Um geeignete Residuen zu bestimmen, deren Austausch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit einen stabilisierenden Effekt zeigt, wurden zunächst bioinformatische Analysen durchgeführt. Basierend auf der Kristallstruktur und auf aus Molekular-Dynamik-Simulationen erhaltenen Strukturensamples wurden dabei die entsprechenden Residuen identifiziert und der stabilisierende Effekt vorhergesagt. Die zehn Mutationen mit dem höchsten vorhergesagten Effekt (siehe 3.2.5. und Anhang 5) wurden dann in D29gp12 eingeführt. Eine der Variante wies allerdings keine lösliche Expressionsausbeute auf und wurde daher nicht weiter untersucht. Für die neun löslichen Varianten wurden hingegen die Schmelzpunkte bestimmt und es zeigte sich, dass die Mutationen H177Y und G184I eine Erhöhung des Schmelzpunktes von + 2,4 °C bzw. +4,6 °C erzeugten. Um zu analysieren, ob diese beiden Mutationen einen additiven Effekt erzielen oder ob ein epistatischer Effekt vorliegt (Wells J. A., 1990), wurde die Kombination dieser Mutationen in der Variante H177Y G184I erzeugt. Dabei ergab diese Doppelmutante eine Stabilisierung um + 6,2 °C, also einen additiven Effekt der beiden Mutationen. In der Folge wurde untersucht, ob andere Residuen an der Position G₁₈₄, die im Gegensatz zu H₁₇₇ im Inneren des Proteins liegt (siehe Anhang 6), einen größeren Effekt erzeugen. Im Hintergrund der H177Y Mutation wurden dafür verschiedene Aminosäuren an dieser Position eingeführt und es konnte mit der Einführung eines Leucin eine weitere Verbesserung des Schmelzpunktes um gesamt + 9,6 °C auf 63,9 °C erreicht werden. Bei der Betrachtung der *in vitro* Aktivität der erzeugten Varianten war hingegen auffällig, dass die Mutation H177Y zu einer Steigerung des Substratumsatzes führte, während G184I und die Doppelmutante H177Y G184I keine Veränderung der *in vitro* Aktivität zeigten. Da die Position H₁₇₇ an der Oberfläche des Proteins liegt und die Seitenkette in der Kristallstruktur lösungsmittlexponiert ist, wurde jedoch keine eindeutige Erklärung für diesen Effekt der Mutation zu dem hydrophoberen Tyrosin gefunden. Auch die Variante H177Y G184P zeigte eine Steigerung der *in vitro* Aktivität, aber eine Reduzierung der thermischen Stabilität um - 1,4 °C. Deswegen wurde für diese Doppelmutante vermutet, dass der Austausch zu Prolin an Position 184, die in einer α -Helix liegt, zu einer Destabilisierung der Tertiärstruktur führt, die aber den Substratumsatz begünstigt.

Damit wurde die Zielsetzung einer möglichst hohen thermischen Stabilisierung ohne Reduktion der enzymatischen Aktivität mit der D29gp12 Variante H177Y G184L erreicht, die mit 63,9 °C einen um +9,6 °C erhöhten Schmelzpunkt ohne *in vitro* Aktivitätsverlust zeigte. Allerdings ist eine Verbesserung der Datenlage der anderen Lysin Kandidaten für eine Verwendung dieser Methodik nötig, da bisher nur die Kristallstruktur von D29gp12 gelöst wurde und die 3D-Strukturen für effiziente bioinformatische Vorhersagen von großer Bedeutung sind.

4.6. Nachweis der antimykobakteriellen Aktivität

Das wichtigste Kriterium eines antibakteriellen Wirkstoffes ist eine starke antibakterielle Wirkung bei einer möglichst niedrigen Wirkstoffdosis. Daher war der Schwerpunkt dieser Arbeit die Untersuchung der antimykobakteriellen Wirkung der ausgewählten Lysine und der erzeugten Artily sine. Zum einen sollte dabei die antimykobakterielle Wirkung der Lysine A Bxz2gp11, D29gp10, TM4gp29 und des Lysin B D29gp12 bestimmt und zum anderen der Einfluss der Fusion mit den ausgewählten Peptiden LL-37, PK, pK34, und SMAP-29 auf die antimykobakterielle Aktivität untersucht werden.

Eine der in der Mikrobiologie gängigsten Methoden für den Nachweis antimikrobieller Aktivität ist die Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) über serielle Verdünnungsreihen (Goldman E. and Green L. H., 2008). Um geeignete Bedingungen zu finden, wurden zunächst Vorversuche (Daten nicht gezeigt) durchgeführt, die für eine Zellzahl von circa 10^9 Zellen pro ml in dem Standard-Aktivitätstest-Puffer, eine Inkubationsdauer von 20 h bei RT (siehe 3.4.1.) und eine Proteinmolarität von 5 μ M (siehe Anhang 9) gute Ergebnisse lieferten. Allerdings wiesen die Lysin B enthaltenden Ansätze eine starke Verklumpung der Zellen auf, obwohl die natürliche Klumpenbildung der Mykobakterien, wie z.B. von Anton V. *et al.*, 1996 gezeigt, mit der von Dubos R. J. *et al.*, 1945 und 1946 beschrieben Methode durch die Zugabe von Tween 80 zu 7H9-Medium und dem Standard-Aktivitätstest-Puffer stark reduziert werden konnte. Vermutlich basierte diese durch das Lysin B erzeugte oder verstärkte Verklumpung auf einer Destabilisierung der Mykomembran und führte zudem zu großen Schwankungen der erhaltenen KBEs und der daraus ermittelten \log_{10} Reduktion.

Trotz dieser Limitierung war die Untersuchung der antimykobakteriellen Wirkung mit dem Standard-Aktivitätstest möglich (siehe 3.4.1.) und es wurde bei der Testung auf *M. smegmatis* SMR5 beobachtet, dass die Inkubation mit Lysin A D29gp10 keine Reduktion der KBE erzeugte. Lysin B D29gp12 und die darauf basierenden Artily sine D29gp12-H-PK und PK-D29gp12-H zeigten hingegen eine Eliminierung der KBE, da das Detektionslimit von 7 \log_{10} Reduktion erhalten wurde. Damit belegten die Daten, dass D29gp12, im Gegensatz zu dem Lysin A, seine Substrate, also Bestandteile der Mykomembran wie das TDM und die Esterbindung der Mykolsäuren mit dem Arabinogalaktan, erreichen konnte und durch die Esterase-Aktivität eine starke antimykobakterielle Wirkung erzeugte. Da jedoch Grover N. *et al.* für die Lysine B Ms6gp3 und Bxz2gp12 nur in der Gegenwart der Detergenzien Tween 80 oder Triton X-100 eine Wachstumsinhibition von *M. smegmatis* beobachten konnte (Grover N. *et al.*, 2014), wurde vermutet, dass auch bei D29gp12 das zugesetzte Tween 80 (0,125 % v/v) die antimykobakterielle Aktivität ermöglichte.

Experimente mit *M. fortuitum* zeigten ebenfalls eine starke antimykobakterielle Wirkung des Lysin B D29gp12, während die Lysine A D29gp10 und TM4gp29 keinen Effekt aufwiesen. Allerdings wurde keine vollständige Eliminierung der KBE sondern eine Reduktion von circa 3,5 \log_{10} beobachtet, was die Untersuchung eines möglichen Synergismus von Lysin A und Lysin B erlaubte. Jedoch ergab

sowohl die Mischung von Lysin A und Lysin B als auch eine Vorinkubation mit Lysin B keine gesteigerte antimykobakterielle Aktivität auf *M. fortuitum*. Lysin A und Lysin B wiesen bei diesen Bedingungen also keinen synergistischen Effekt auf.

Zudem wurde der Effekt der Fusion mit AMPs untersucht und es wurde sowohl bei dem Artilysin A pK34-TM4gp29-H, als auch bei den Artilysinen B D29gp12-H-PK und PK-D29gp12-H alleine und in der Mischung keine Verbesserung der KBE Reduktion beobachtet. Damit zeigten die Ergebnisse, dass die N-terminale Fusion des pK34 Peptides an TM4gp29 nicht geeignet war, um dem erzeugten Artilysin A die Überwindung der Mykomembran zu ermöglichen. Auch die Fusion des PK Peptides an D29gp12 ergab keine Verbesserung der antimykobakteriellen Aktivität gegen *M. fortuitum*.

Um nun diese beobachteten Effekte zu überprüfen und die Aktivität der Proteine auf dem Vertreter der langsam wachsenden Mykobakterien *M. bovis* BCG zu untersuchen, wurden Wachstumsinhibitionsexperimente mit dem BactecMGIT 960 System (Williams-Bouyer N. *et al.*, 2000) durchgeführt (siehe 3.4.2.). Da das Lysin B D29gp12 allerdings nur eine geringe thermische Stabilität der Esterase-Aktivität bei über 30 °C aufweist (Hou L. *et al.*, 2010) war eine Anpassung der Methode notwendig. Daher wurde, anstatt der direkten Inkubation in den MGIT Röhrchen, eine Vorinkubation der zu testenden Mykobakterien mit den Lysinen bzw. Artilysinen unter Standard-Aktivitätstest-Bedingungen für 20h bei RT durchgeführt und die MGIT Röhrchen mit diesen so behandelten Zellen beimpft.

Für *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum* wurde dabei für die Lysine A Bxz2gp11-H, D29gp10-H und TM4gp29-H und die auf TM4gp29-H und den AMPs PK und pK34 basierenden Artily sine keine Wachstumsinhibition beobachtet, während nach der Inkubation mit Lysin B D29gp12 kein Wachstum detektierbar war. Damit zeigten die Wachstumsinhibitionsexperimente zu der Untersuchung der KBE Reduktion vergleichbare Ergebnisse. Auffällig war hingegen, dass die Enzyme Lysozym und Lipase auf *M. smegmatis* SMR5 zu einer völligen Wachstumsinhibition führten, während für *M. fortuitum*, trotz der um den Faktor 10 höheren Molarität des Lysozyms, nur eine Verzögerung des Wachstums beobachtet wurde. Während die höhere Lysozymresistenz von *M. fortuitum* bereits bekannt war (Gordon R. E. and Barnett D. A., 1977; Kanetsuna F., 1980), legten die Beobachtungen der Wachstumsinhibition (siehe 3.4.2.) jedoch dieselbe Schlussfolgerung für die verwendete Lipase nahe, da diese, im Gegensatz zu dem Lysin B, keine vollständigen Wachstumsinhibition zeigte. Deswegen wurde vermutet, dass die Unterschiede der Modifikationen der Mykolsäuren von *M. fortuitum* und *M. smegmatis* zu der im Vergleich zu dem Lysin B geringeren antimykobakteriellen Aktivität der Lipase führen.

Bei den Experimenten mit dem langsam wachsenden *M. bovis* BCG wurde hingegen für das Lysin B keine vollständige Inhibition sondern eine signifikante Verzögerung des Wachstums beobachtet.

Damit zeigte dieses Ergebnis, dass D29gp12 eine geringere antimykobakterielle Aktivität gegen *M. bovis* BCG als gegen *M. smegmatis* und *M. fortuitum* aufwies, wobei dieser Effekt auf der im Vergleich stärkeren Zellverklumpung von *M. bovis* BCG basieren könnte, da die Zellen im Inneren der Klumpen möglicherweise gegen die Wirkung der Lysine bzw. Artily sine abgeschirmt wurden. Auch bei den Ergebnissen der Artily sine zeigten sich Unterschiede zu *M. smegmatis* und *M. fortuitum*. Während die Artily sine B und die Artily sine A mit N-terminaler Peptidfusion keine verbesserte Aktivität zeigten, ergaben jedoch die Artily sine A TM4gp29-H-PK und TM4gp29-H-pK34, im Gegensatz zu den Lysinen A, eine Wachstumsinhibition. Daher belegten die Experimente, dass die C-terminale Fusion der AMPs PK bzw. pK34 an das Lysin A TM4gp29 dem Artily sin eine wachstumsinhibitorische Aktivität auf *M. bovis* BCG ermöglichte. Dabei basierte diese antimykobakterielle Wirkung vermutlich auf dem Abbau des Peptidoglykans, da die Artily sine TM4gp29-H-PK und TM4gp29-H-pK34 durch das C-terminalen AMP die Mykomembran überwinden könnten. Allerdings hatten diese Artily sine A weiterhin eine signifikant geringere Wirkung als das Lysin B D29gp12 und ergaben auch in der Mischung mit dem Lysin B keine verbesserte Wachstumsinhibition. Jedoch zeigte die Mischung aus dem Artily sin A pK34-TM4gp29-H, das keinen Effekt aufwies, und D29gp12-H eine im Vergleich zu dem Lysin B erhöhte Verzögerung der Wachstumsdetektion und damit potentiell einen synergistischen Effekt, wobei dieser mit weiteren Experimenten bestätigt werden muss. Zudem sollte auch untersucht werden ob eine vollständige Wachstumsinhibition auf *M. bovis* BCG durch eine Optimierung der Bedingungen erreicht werden kann. So würde beispielsweise eine höhere Lysin- bzw. Artily sin-Dosis vermutlich signifikante Verbesserungen ermöglichen, wobei aufgrund der Aggregationstendenz der Proteine bisher keine höheren Proteinmolaritäten eingesetzt werden konnten. Folglich sollte für zukünftige Experimente auch die Optimierung der Löslichkeit der Lysine bzw. Artily sine ein zentraler Teil der Untersuchungen sein. Auch eine längere Inkubationszeit mit den Enzymen wäre vorstellbar, da auch für *M. smegmatis* eine Verbesserung der KBE Reduktion durch eine Verlängerung der Inkubationszeit erreicht wurde. Allerdings publizierten Hou L. *et al.*, 2010, dass D29gp12 nur eine geringe Langzeitstabilität der Esterase-Aktivität bei 30 °C zeigte (Hou L. *et al.*, 2010), was für eine langfristige Inkubation bei 37 °C äußerst problematisch ist. Jedoch konnte bei den Wachstumsinhibitionstestbedingungen nicht untersucht werden, nach welcher Zeitspanne die Lysine bei 37 °C eine Reduktion oder einen kompletten Verlust ihrer antimykobakteriellen Aktivität aufweisen. Deswegen sollten zukünftige Arbeiten auch eine Untersuchung der Langzeitstabilität der antimykobakteriellen Aktivität bei für die therapeutische Anwendung relevanten Temperaturen, also 37 °C bis circa 40 °C, einschließen. Dabei könnte die thermisch stabilisierte Variante von D29gp12 eine Basis für die Untersuchungen darstellen, da die erhöhte thermische Stabilität möglicherweise auch eine Verbesserung der Langzeitstabilität der Esterase-Aktivität bei diesen Temperaturen ergibt.

Für die Validierung der bisherigen Ergebnisse und weitere Untersuchung wurde zudem die Stoffwechselaktivität anhand der ATP abhängigen Lumineszenz (Zourob M. *et al.*, 2008) und die Veränderung der *hsp65* Kopienzahl mittels der quantitativen-PCR (qPCR) (Filion M., 2012) untersucht. Für den Nachweis des Stoffwechselproduktes ATP wurde die Luziferase genutzt, was einen Rückschluss auf die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen erlaubt. Diese Methode ergab klare Effekte (siehe 3.4.3.), obwohl große Schwankungen der Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Messungen beobachtet wurden. So zeigte das Lysin A TM4gp29 und die darauf basierenden Artily sine A im Rahmen des Fehlers keine Reduktion, während das Lysin B D29gp12, das getestete Artily sin B pK34-D29gp12-H und die Vergleichsenzymmischung auf *M. smegmatis* SMR5 eine fast vollständige Eliminierung der stoffwechselaktiven Zellen ergab. Auch auf *M. fortuitum* wiesen das Lysin A und die Artily sine A nur eine geringe Reduktion auf, die in Anbetracht des Fehlers als keine Aktivität bewertet wurde. Das Lysin B D29gp12 und das Artily sin B pK34-D29gp12-H zeigten hingegen auch bei dieser Spezies eine gute Aktivität, wobei die antimykobakterielle Wirkung geringfügig schwächer war. Zudem war für den Ansatz der Vergleichsenzyme Lysozym und Lipase auffällig, dass bei den pelletierten Zellen eine geringere Reduktion als für das Lysin B erzeugt wurde. Im Rahmen der großen Messschwankungen würde dieser Effekt der Beobachtung aus den Wachstumsinhibitionsversuchen entsprechen. Damit waren diese Resultate mit den bisherigen Ergebnissen vergleichbar und belegten, dass die stoffwechselaktiven Zellen durch die antimykobakterielle Aktivität des Lysin B bei *M. smegmatis* eliminiert und bei *M. fortuitum* signifikant reduziert wurden. Im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen zeigten bei *M. bovis* BCG jedoch die Zellsuspension und die pelletierten Zellen deutliche Unterschiede. Dabei wurde bei den Ansätzen des Lysins B und der Artily sine B mehrheitlich eine höhere Reduktion bei den pelletierten Zellen beobachtet. Dieser Effekt könnte auf der starken, auch in der Lichtmikroskopie beobachteten Zellverklumpung (Daten nicht gezeigt) basieren, die die Lyse der Zellen und damit die Freisetzung des ATP erschweren könnte. Dennoch war klar erkennbar, dass das Lysin B, die Artily sine B, die Vergleichsenzyme und die Artily sine A TM4gp29-H-PK und TM4gp29-H-pK34 eine Reduktion und dadurch eine antimykobakterielle Aktivität zeigten, während für das Lysin A und die Artily sine A mit den N-terminalen Fusionen kein Einfluss auf die Zellen beobachtet wurde. Damit waren die Ergebnisse auf *M. bovis* BCG sehr gut mit den Resultaten der Wachstumsinhibitionszeiten vergleichbar.

Auch die Quantifizierung der *hsp65* Kopienzahl mittels qPCR zeigte Resultate, die den Ergebnissen der anderen Methoden entsprachen. So wurde sowohl auf *M. smegmatis* SMR5 als auch auf *M. fortuitum* keine Reduktion durch die Lysine A Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 erzeugt, während das Lysin B D29gp12 und das Artily sin B D29gp12-H-PK eine Eliminierung bzw. starke Reduktion der Reportgen-Kopienzahl zeigten (siehe 3.4.4.). Jedoch war auch bei diesen Experimenten auffällig, dass

Lysozym und Lipase auf *M. smegmatis* SMR5 eine Eliminierung und auf *M. fortuitum* keine Reduktion ergaben. Deswegen wurde gefolgert, dass diese höhere Toleranz gegen die Vergleichsenzyme bei *M. fortuitum* kein artifizierter Effekt der Wachstumsinhibitionsversuche, sondern eine bei diesen Bedingungen vorliegende Eigenschaft war, die vermutlich auf den unterschiedlichen Modifikationen der Zellwand basierte.

Zudem belegten die vergleichbaren Ergebnisse für Wachstumsinhibition, Nachweis stoffwechselaktiver Zellen und Quantifizierung der *hsp65* Kopienzahl, dass das Lysin B D29gp12 und die darauf basierenden Artily sine eine antimykobakterielle Wirkung auf die Vertreter der schnell wachsenden *M. smegmatis* und *M. fortuitum* und der langsam wachsenden *M. bovis* BCG haben, was die ursprüngliche Annahme des breiten Wirtsspektrums des D29 Lysin B bestätigte. Auch konnte belegt werden, dass die Artily sine A TM4gp29-H-PK und TM4gp29-H-pK34 durch die Fusion eine Aktivität gegen *M. bovis* BCG erlangt haben, was die prinzipielle Übertragbarkeit des Artily sin Konzeptes auf Mykobakterien nahelegt. Allerdings konnte nur bei der Wachstumsinhibition Aussagen über den möglichen Synergismus zwischen der Aktivität des Lysin A und des Lysin B gemacht werden und es wurde nur in einem Experiment ein Hinweis für einen Synergismus gefunden. Daher ist ein Synergismus zwischen Lysin A und Lysin B möglich, jedoch für die antimykobakterielle Wirkung nicht notwendig. Allerdings sollten weitere Kombinationen aus Lysinen und Mykobakterienstämmen untersucht werden, um zu überprüfen, ob bei anderen klinisch relevanten Mykobakterien wie *M. leprae*, *M. tuberculosis* oder *M. abscessus* ein Synergismus vorliegt, der eine deutliche Erleichterung bei der Anwendung der Lysine bzw. Artily sine als antimykobakterielle Wirkstoffe darstellen würde. Auch das Spektrum der getesteten Mykobakterienarten sollte bei künftigen Untersuchungen erweitert werden, da die mykobakteriellen Spezies und sogar die Stämme Unterschiede in den Modifikationen ihrer Zellwand aufweisen können. Folglich wären andere Dosen für eine effiziente Behandlung notwendig, was in dieser Arbeit an der im Vergleich zu *M. smegmatis* geringeren Anfälligkeit von *M. bovis* BCG und *M. fortuitum* für die getesteten Lysine und Artily sine erkennbar war.

4.7. Bestimmung der *minimal-inhibitory-concentration* (MIC) auf *M. smegmatis*

Da die antimykobakterielle Wirkung qualitativ gezeigt werden konnte, wurde zudem eine Quantifizierung durchgeführt. Dafür ist die Bestimmung der *minimal-inhibitory-concentration* eines Wirkstoffes eine der gängigsten Methoden (Goldman E. and Green L. H., 2008) und wurde bereits in verschiedenen Variationen für Mykobakterien etabliert (Taneja N. K. and Tyagi J. S., 2007; Coban A. Y. *et al.*, 2015). Allerdings war eine direkte Auswertung über die optische Dichte aufgrund der Zellverklumpung nicht praktikabel und deswegen wurde in dieser Arbeit der Nachweis lebender

Zellen über die Reduktion von Resazurin gewählt, die eine hohe Sensitivität und Genauigkeit ermöglicht (Taneja N. K. and Tyagi J. S., 2007). Entgegen der üblichen Vorgehensweise wurden jedoch nicht Wirkstoffkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$), sondern Molaritäten (nM) verwendet, um den unterschiedlichen Molekulargewichten der Proteine Rechnung zu tragen und damit gleiche Molekülmengen miteinander vergleichen zu können. Zudem war die maximal testbare Proteinmolarität auf circa $1\text{ }\mu\text{M}$ limitiert, da das Tween 80 in dem 7H9-Medium bei höheren Molaritäten zu einer Aggregation mehrerer Lysine führte (nicht gezeigte Daten).

Die Untersuchungen zeigten dabei (siehe 3.4.5.), dass die Lysine A D29gp10 und TM4gp29 und die auf TM4gp29 und den Peptiden PK und pK34 basierenden Artilysine A auch bei $1\text{ }\mu\text{M}$ keine Wachstumsinhibition der beiden getesteten *M. smegmatis* Stämme SMR5 und DSM 43468 erzeugten. Betrachtet man allerdings die für die Lysine A Ms6gp3 (Mahapatra S. *et al.*, 2013) und BTCU-1_ORF7 (Lai M. J. *et al.*, 2015) publizierten MIC Untersuchungen (siehe Anhang 10), war die maximal verwendbare Molarität möglicherweise zu gering, da für Ms6gp3 bis $11,6\text{ }\mu\text{M}$ kein Effekt auf *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* beobachtet wurde und auch BTCU-1_ORF7 bis $1,3\text{ }\mu\text{M}$ keine Wachstumsinhibition auf *M. smegmatis* zeigte. Allerdings zeigten die weiteren Untersuchungen von Lai M. J. *et al.*, dass $100\mu\text{g/ml}$ und damit $1,6\text{ }\mu\text{M}$ BTCU-1_ORF7 einen antimykobakteriellen Effekt ergaben. Somit ist es durchaus vorstellbar, dass die mögliche MIC von D29gp10 und TM4gp29 bzw. den Artilysinen A in zukünftigen Untersuchungen durch eine Verbesserung der Löslichkeit dieser Proteine erreicht werden kann. Im Vergleich zu den MIC-Werten anderer Endolysine aus Phagen Gram positiver Organismen (siehe Anhang 10) ist zudem auffällig, dass häufig deutlich niedrigere Proteinkonzentrationen für eine Wachstumsinhibition ausreichend sind. So erreichen beispielsweise LysH5 und LysK auf *S. aureus* bereits bei $0,05$ bis $0,1\text{ }\mu\text{M}$ bzw. bei $0,6\text{ }\mu\text{M}$ und PlyC auf *S. pyogenes* bereits bei $0,175\text{ }\mu\text{M}$ die MIC. Auch das breit wirksame Endolysin PlySs2 zeigt auf *S. aureus* und *L. monocytogenes* mit 16 bis $32\text{ }\mu\text{g/ml}$ bzw. $8\text{ }\mu\text{g/ml}$ eine niedrige MIC. Somit wiesen diese Endolysine bei der Anwendung von außen bereits bei geringeren Proteinkonzentrationen als die Lysine A ihre antibakterielle Wirkung auf. Allerdings basiert dieser Unterschied vermutlich auf der Barrierefunktion der Mykomembran, die, wie die äußere Membran Gram negativer Bakterien, das Peptidoglykan für die Lysine A schwerer oder gar unzugänglich macht. Folglich zeigt die Aktivität des Lysin A BTCU-1_ORF7 von außen, dass dieses Lysin A die Mykomembran überwinden kann. Für künftige Untersuchungen könnten also vor allem solche Lysine A vielversprechend sein, die bei in den Tests anwendbaren Proteinkonzentrationen Membranen überwinden können. Diese Eigenschaft würde auch die Entwicklung von Artilysinen deutlich erleichtern, da durch die Fusion mit den antimikrobiellen Peptiden der Transport über die Mykomembran weiter verbessert werden sollte.

Im Gegensatz zu den Lysinen A bzw. Artilysinen A ergab jedoch Lysin B D29gp12 bereits bei 16 bzw. 20 nM eine Wachstumsinhibition und wies damit eine starke antimykobakterielle Aktivität auf. Auch

die Artily sine B aus D29gp12 und den Peptiden LL-37, PK, pK34 und SMAP-29 zeigten eine sehr gute Wirkung auf beide Stämme, wobei die MIC mit der des Lysin B vergleichbar oder geringfügig höher war. Da die Molarität der Fusionen von D29gp12 mit LL-37 und SMAP-29 allerdings nur grob bestimmt werden konnte (siehe 4.3.), war für diese Peptide keine klare Aussage über eine potentielle Verbesserung der Aktivität möglich. Daher sollten zukünftig Proteinreinigungsverfahren entwickelt werden, die auch bei Artily sinen mit geringen löslichen Ausbeuten eine gute Reinheit ergeben, damit diese Proteine ohne derartige Fehler untersucht werden können. Für die Artily sine B mit den AMPs PK und pK34 war die Proteinreinheit hingegen ausreichend und deswegen wurde gefolgert, dass die Fusion mit diesen Peptiden keine Verbesserung der antimykobakteriellen Aktivität des Lysins B erzeugte. Folglich konnte von einer starken antimykobakteriellen Aktivität des Peptides, wie sie für pK34 bekannt ist (Teng T. *et al.*, 2015), nicht zwingend auf eine gute Eignung dieses Peptids als Fusionspartner für die Entwicklung der Artily sine geschlossen werden. Dieser Effekt ist allerdings nicht ungewöhnlich, da durch die Fusion die Interaktion des Peptides mit der Membran verändert werden kann. Daher sollten in künftigen Projekten auch Linker zwischen den Peptiden und den Lysinen in Betracht gezogen werden, um eine mögliche Verbesserung durch den größeren räumlichen Abstand zwischen dem Peptid und dem Protein zu untersuchen. Zudem könnte auch die gezielte Optimierung der Selektivität der AMPs für Mykobakterien, wie sie beispielsweise von Sharma A. *et al.*, 2015 oder Khara J. S. *et al.*, 2015 gezeigt wurde, auch bei Artily sinen zu besseren Resultaten führen. Jedoch könnte die Eigenschaft mancher AMPs, auch einen Transport in eukaryontische Zellen zu ermöglichen (Splith K. and Neundorff I., 2011; Rodriguez Plaza J. G. *et al.*, 2014; Bahnsen J. S. *et al.*, 2015), durch die Optimierung gestört werden. Dann wäre für die Behandlung von intrazellulären Mykobakterien die Fusion des Artily sins mit sogenannten *protein-transduction-domains* (Bechara C. and Sagan S., 2013) notwendig, um eine effiziente Aufnahme in die befallenen Wirtszellen zu gewährleisten. Folglich sollte in zukünftigen Projekten auch die Internalisierung der antimykobakteriellen Artily sine in eukaryontischen Zellen untersucht werden.

Während die Lysine bei beiden Stämmen im Rahmen des Fehlers vergleichbare MIC Werte ergaben, wies jedoch das Vergleichsenzym Lipase (*P. fluorescens*) eine unterschiedlich starke Wirkung auf. So war die auf den Stamm SMR5 erhaltenen MIC mit der von D29gp12 vergleichbar, während bei dem Stamm DSM 43468 eine circa doppelt so hohe MIC beobachtet wurde. Damit zeigten diese Experimente, dass der Stamm DSM 43468 eine höhere Toleranz gegen die verwendete Lipase aufwies, wobei dieser Effekt auch auf Unterschieden in den Populationen der beiden Stämme basieren könnte. Vor allem durch die asymmetrische Zellteilung der Mykobakterien, die zu einer Population aus großen, sich schnell teilenden und kleinen, sich langsam teilenden Zellen führt (Hett E. C. and Rubin E. J., 2008; Kieser K. J. and Rubin E. J., 2014), könnten unterschiedliche Zusammensetzungen der Populationen der beiden Stämme entstehen. Zudem wären auch

Unterschiede in der Anpassung an die stationäre Phase (Smeulders M. J. *et al.*, 1999), in der die *M. smegmatis* Zellen beispielsweise eine höhere negative Nettoladungsdichte ihrer Zelloberfläche aufweisen (Patru M.-M. and Pavelka M. S., 2010), oder ein höherer Anteil an Zellen mit Lipidkörpern, die eine erhöhte Antibiotikaresistenz erzeugen (Hammond R. J. *et al.*, 2015), vorstellbar. Für das Lysin B D29gp12 hingegen hatte der Effekt, der die beobachteten Unterschiede in der Toleranz gegen Lipase erzeugte, keinen signifikanten Einfluss, da die MIC zwischen den beiden Stämmen vergleichbar war. Daher wurde vermutet, dass das Lysin B solche Unterschiede tolerieren kann, was für Mykobakteriophagen einen essentiellen Vorteil darstellen würde, da die Unterstützung der Lyse der Wirtszelle unabhängig von dem durch äußere Einflüsse erzeugten Grad der Modifikationen wäre.

Zusammenfassend belegten die Untersuchungen damit, dass das Lysin B D29gp12 bei der Zugabe von außen eine starke antimykobakterielle Aktivität gegen *M. smegmatis* aufweist, wie es auch von Gil F. *et al.* für Ms6gp3 und von Grover N. *et al.* für Bxz2gp12 gezeigt werden konnte. Allerdings belegten die Untersuchungen von Grover N. *et al.*, dass die *in vitro* Aktivität der Lysine B Ms6gp3 und Bxz2gp12 durch die Zugabe von 0,002 % v/v Triton-X100 oder 0,05 % v/v Tween 80 gesteigert werden konnte und dass nur in Gegenwart dieser Detergenzien eine Wachstumsinhibition durch die Lysine B möglich war (Grover N. *et al.*, 2014). Da in dieser Arbeit nur 0,0375 % v/v Tween 80 bei der Bestimmung der MIC in den Ansätzen vorlag (siehe 3.4.5.), war für D29gp12 eine Verbesserung der antimykobakteriellen Aktivität durch eine weitere Detergenzienzugabe vorstellbar. Folglich wurde zum einen ein auf 0,0875 % v/v erhöhter Anteil von Tween 80 und zum anderen die Mischung mit 0,002 % v/v Triton X-100, also 0,002 % v/v Triton-X100 und 0,0375 % v/v Tween 80, untersucht. Dabei ergaben die Experimente einen 3,5- bzw. 4-fach höheren 4-Nitrophenylacetatumsatz (siehe Anhang 11) und eine um circa Faktor 2 reduzierte, also verbesserte MIC. Somit wurden enzymatische und antimykobakterielle Aktivität des Lysins B D29gp12 durch die Zugabe von Tween 80 oder Triton X-100 signifikant gesteigert. Allerdings war bei dem Vergleich der für D29gp12 erhaltenen mit den von Grover N. *et al.*, 2014 für Bxz2gp12 publizierten MIC-Werten auffällig, dass D29gp12, trotz der geringeren Tween 80 Menge, eine 40-fach niedrigere MIC aufwies. Zudem wurde dieser Effekt durch die Aktivitätssteigerung bei der weiteren Zugabe von Triton-X100 oder Tween 80 auf circa Faktor 100 bzw. Faktor 90 verstärkt. Diese großen Unterschiede könnten teilweise durch die unterschiedlichen von Grover N. *et al.* verwendeten Reaktionsbedingungen und dem verwendeten *M. smegmatis* Stamm entstanden sein. Dennoch wurde gefolgert, dass das Lysin B D29gp12, trotz der niedrigeren *in vitro* Aktivität (siehe 3.3.1.), eine deutlich höhere antimykobakterielle Aktivität als Bxz2gp12 aufweist. Auch bei dem Vergleich von D29gp12 mit der von Yang Y. *et al.* beschriebenen Trehalose-Dimycolathydrolase (TDMH) zeigte das Lysin B mit mindestens 6 \log_{10} Reduktion der KBE (siehe 3.4.1.) eine deutlich größere antimykobakterielle Wirkung gegen *M. smegmatis* als die von Yang Y. *et al.* publizierten 1 \log_{10} Reduktion der KBE durch die TDMH (Yang Y. *et al.*, 2013). Für

M. bovis zeigten allerdings beide Enzyme eine starke Aktivität, wobei eine Reduktion der KBE um $5 \log_{10}$ für die TDMH beobachtet wurde (Yang Y. *et al.*, 2013) und D29gp12 eine signifikante Reduktion der ATP-Menge (siehe 3.4.3.) und eine um den Faktor 3 erhöhte Wachstumsdetektionszeit (siehe 3.4.2.) ergab. Da diese Methoden jedoch keinen direkten Vergleich der beiden Enzyme erlaubten, sollte in zukünftigen Projekten auch der Standard-Aktivitätstest für *M. bovis* etabliert werden, um diesen zu ermöglichen.

Während bei den Experimenten mit TDMH Tween 80 verwendet (Yang Y. *et al.*, 2013) und für die Wachstumsinhibition durch Bxz2gp12 und Ms6gp3 gezeigt wurde, dass Tween 80 oder Triton-X100 notwendig ist (Grover N. *et al.*, 2014), ergab das in der kürzlich erschienen Arbeit von Lai M. J. *et al.* beschriebene Lysin B des Phagen BTCU-1 allerdings ohne Detergenzzugabe eine antimykobakterielle Aktivität (Lai M. J. *et al.*, 2015). Damit belegten Lai M. J. *et al.* erstmals, dass ein Lysin B die Mykomembran ohne ein Transportpeptid und ohne eine Membrandestabilisierung durch Detergenzien überwinden kann. Da D29gp12 mit circa 20 nM eine im Vergleich zu Bxz2gp12 sehr niedrige MIC aufweist und das BTCU-1 Lysin B gegen *M. smegmatis* ohne Detergenz eine um 30- bis 60-Fach höhere MIC als D29gp12 mit 0,0375 % Tween 80 zeigt, legte dies die Vermutung nahe, dass auch D29gp12 die Mykomembran ohne Hilfsmittel überwinden könnte. Sollte sich diese Annahme in künftigen Untersuchungen bestätigen, wäre keine Peptidfusion für die antimykobakterielle Wirkung auf *M. smegmatis* notwendig. Folglich könnte man für die Erzeugung der D29gp12 basierten Artilysine die Auswahl der Peptide nach einer breiten Testung unterschiedlicher Mykobakterienstämme gegebenenfalls auf solche beschränken, die eine Internalisierung in eukaryontische Zellen ermöglichen oder die Wirkung des Lysins B verstärken.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen somit, dass das Lysin B D29gp12 nicht nur aufgrund seiner starken antimykobakteriellen Aktivität, die signifikant höher als bei Bxz2gp12 und Ms6gp3 ist, sondern auch aufgrund dieser potentiellen Eigenschaft der Überwindung der Mykomembran ein für die Entwicklung neuer antimykobakterieller Wirkstoffe exzellent geeigneter Kandidat ist.

4.8. Visualisierung des Effektes der Lysine bzw. Artilysine auf die mykobakteriellen Zellen

Um den antimykobakteriellen Effekt der Lysine und Artilysine zu visualisieren wurden zudem die Lebend-Tot-Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen und die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie genutzt.

Bei der Lebend-Tot-Färbung werden die Zellen mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, dem grün fluoreszierenden Syto-9 und dem rot fluoreszierenden Propidiumiodid inkubiert. Aufgrund seiner biophysikalischen Eigenschaften kann Propidiumiodid, im Gegensatz zu Syto-9, dabei nur geschädigte Membranen überwinden. Deswegen findet nur bei geschädigten Zellen eine Verdrängung des Syto-9

und dadurch eine Änderung der Fluoreszenz von Grün zu Rot statt. Jedoch wies bei den durchgeführten Experimenten die Mehrheit der Propidiumiodid gefärbten Mykobakterien sowohl für *M. smegmatis* SMR5, als auch für *M. fortuitum* keine rote sondern eine gelbe Färbung auf (siehe 3.4.6.). Dieser Effekt basierte vermutlich auf einer unvollständigen Verdrängung des Syto-9 Farbstoffes, die zu einer Überlagerung der Roten und Grünen Fluoreszenz führte. Dennoch wurde, auch aufgrund der zugehörigen Ergebnisse der antimykobakteriellen Aktivität, aus der Einlagerung des Propidiumiodid auf eine Schädigung der Zellen geschlossen. Neben diesem Färbungseffekt waren auch die Ergebnisse der mikroskopischen Beobachtungen für *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum* vergleichbar. So zeigten beide Arten bei den Kontrollansätzen vereinzelte geschädigte Zellen, die aber erfahrungsgemäß in jeder Bakterienpopulation mit höherer Zelldichte vorliegen. Auch die Behandlung mit Lysin A TM4gp29-H bzw. Artilysin A TM4gp29-H-PK erzeugte keine Schädigung der Zellen. Im Gegensatz dazu war bei der Inkubation mit Lysin B D29gp12 und Artilysin B pK34-D29gp12-H die Mehrheit der Zellen geschädigt, was auch für die Ansätze mit den Vergleichsenzymen Lysozym und Lipase beobachtet wurde. Damit belegten die Aufnahmen die in der Aktivitätstestung beschriebenen Ergebnisse und Folgerungen, dass das Lysin B und das Artilysin B für eine Schädigung der mykobakteriellen Zellen bei *M. smegmatis* und *M. fortuitum* von außen ausreichend ist. Allerdings ließen die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen aufgrund der zu geringen Auflösung keine weiterführenden Schlussfolgerungen über den genauen Effekt der Lysine zu. Um diesen besser untersuchen zu können, wurden deswegen TEM-Aufnahmen von unbehandelten und Lysin behandelten *M. smegmatis* SMR5 Zellen erstellt (siehe 3.4.7.). Die Bilder zeigten dabei für die Kontrolle mit Lagerungspuffer und für die Inkubation mit Lysin A TM4gp29 intakte, stäbchenförmige Zellen mit einer unauffälligen Elektronendichte. Diese Beobachtung belegte damit, dass das Lysin A bei den verwendeten Bedingungen keine Aktivität auf die *M. smegmatis* Zellen aufweist. Auch bei der Behandlung mit dem Lysin B D29gp12 und dem Artilysin B PK-D29gp12-H war die Stäbchen-Morphologie klar erkennbar und intakt. Jedoch wiesen die Zellen eine deutlich reduzierte Elektronendichte auf, die auf einen Verlust von zytoplasmischem Material hindeutete. Diese Vermutung wurde durch die verschiedenen, in der Umgebung der Zellen abgebildeten Objekte bestätigt, die als eben solche zytoplasmische Bestandteile, z.B. als Ribosomen, interpretiert wurden. Die Inkubation mit der Kombination aus Lysin A D29gp10 und Artilysin B PK-D29gp12 zeigte hingegen neben dem Verlust des zytoplasmischen Materials eine starke Fragmentierung der Zellen. Dabei wurde dieser Verlust der Stäbchen-Morphologie auf die Aktivität des Lysin A zurückgeführt und es wurde zudem gefolgert, dass das Peptidoglykan durch die Lysin B Aktivität für Lysin A zugänglich gemacht wurde.

Zusammenfassend ergaben die mikroskopischen Untersuchungen damit, dass das Lysin B bzw. Artilysin B, im Gegensatz zu dem Lysin A bzw. Artilysin A, auf *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum*

von außen wirksam ist. Zudem zeigten die TEM Aufnahmen anhand der Morphologie, dass die Aktivität des Lysin B keine Lyse der *M. smegmatis* Zellen zur Folge hatte, sondern belegten anhand der Reduktion der Elektronendichte, dass Teile des Zytoplasmas aus den Zellen ausgetreten waren. Daher legten diese Experimente den Schluss nahe, dass die antimykobakterielle Wirkung des Lysin B D29gp12 auf einer Destabilisierung der Mykomembran und dem folgenden Verlust von zytoplasmischem Material beruhte. Zudem unterstützte der von Yang Y. *et al.*, 2013 für die TDMH in ihren elektronenmikroskopischen-Aufnahmen gezeigte Verlust von zytoplasmischem Material, der äußeren Hülle und die Lyse der *M. smegmatis* Zellen, diese Folgerung, da D29gp12 und TDMH Esterasen und ihre Substrate Komponenten der Mykomembran wie das TDM sind. Außerdem zeigte die durch die Behandlung mit der Kombination aus Lysin A und Artilysin B erzeugte Fragmentierung der *M. smegmatis* Zellen, dass das Peptidoglykan durch die Lysin B Aktivität für das Lysin A zugänglich wurde.

4.9. Zentrale Aussage und Ausblick

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Daten zu Aktivität und Charakterisierung der biophysikalischen Eigenschaften der Lysine von Mykobakteriophagen verfügbar. Während aus bioinformatischen Analysen für mehrere hundert Lysine A die Domänenzusammensetzung und vermutliche biochemische Aktivität der einzelnen Domänen publiziert war (Payne K. M. and Hatfull G. F., 2012), war nur für die Lysine A Ms6gp2 (Garcia M. *et al.*, 2002; Mahapatra S. *et al.*, 2013), TM4gp29 (Henry M. *et al.*, 2010), Corndoggp69, Bxz1gp236 und Che8gp32 (Payne K. *et al.*, 2009) die enzymatische Aktivität des rekombinant hergestellten Proteins gezeigt und zumindest teilweise charakterisiert. Allerdings konnte für weitere Lysine A wie z.B. D29gp10 und L5gp10 gezeigt werden, dass eine Expression in *M. smegmatis* zu einer Lyse der Zellen führte (Payne K. M. and Hatfull G. F., 2012). Von den bioinformatisch identifizierten Lysinen B waren jedoch nur Ms6gp3 (Gil F. *et al.*, 2008; Gil F. *et al.*, 2010) und D29gp12 (Payne K. *et al.*, 2009) charakterisiert worden, wobei Payne K. *et al.* auch die Kristallstruktur von D29gp12 publizierten. Eine antimykobakterielle Aktivität nach Zugabe von außen war nur für die Lysine des Mykobakteriophagen Ms6 veröffentlicht. Dabei zeigte das Lysin A keine Wachstumsinhibition (Mahapatra S. *et al.*, 2013), während das Lysin B in Gegenwart von Tween 80 *M. smegmatis* abtöten konnte (Gil F. *et al.*, 2010). Jedoch vermuteten Gil F. *et al.*, dass die Abtötung auf einem Umsatz von Tween 80 zu Ölsäure und nicht auf einer antimykobakteriellen Wirkung des Lysins B beruhte. Folglich war für die Entwicklung von Lysinen als antimykobakterielle Wirkstoffe und für die Erzeugung von Artilysinen zunächst die Charakterisierung weiterer vielversprechender Lysine nötig. Dafür wurden in dieser Arbeit zunächst die Lysine A und B der vier Mykobakteriophagen Bxz2, D29,

L5 und TM4, die ein breites Wirtsspektrum aufweisen (Rybníček J. *et al.*, 2006), rekombinant hergestellt. Allerdings wurde nur für die Lysine A Bxz2gp11, D29gp10 und TM4gp29 und das Lysin B D29gp12 eine ausreichende Menge, Reinheit und Löslichkeit erhalten, die die Untersuchungen verschiedener biophysikalischer Charakteristika und die Bestimmung der antimykobakteriellen Aktivität erlaubte. Dabei wiesen sowohl die Lysine A als auch das Lysin B eine starke Aggregationstendenz auf, die vermutlich auf einer hohen Hydrophobizität der Proteinoberfläche basierte und die maximal einsetzbare Messkonzentration limitierte.

Während in der Folge die enzymatische Aktivität dieser Lysine A gezeigt werden konnte, wurde jedoch keine antimykobakterielle Wirkung von außen auf die mykobakteriellen Zellen beobachtet. Dieser Effekt war also mit den Beobachtungen für verschiedene Endolysine gegen Gram negative Bakterien vergleichbar (Nelson D. C. *et al.*, 2012), was die Theorie unterstützt, dass die Mykomembran, genauso wie die äußere Membran Gram negativer Bakterien, eine effektive Barriere darstellt. Das Lysin B D29gp12 zeigte hingegen eine starke antimykobakterielle Aktivität auf *M. smegmatis*, *M. fortuitum* und *M. bovis* BCG und konnte folglich die Mykomembran dieser Arten in der Gegenwart von Tween 80 überwinden. Somit unterstützen diese Resultate die Studien von Grover N. *et al.* und Yang Y. *et al.*, die für die Lysine B Bxz2gp12 und Ms6gp3 auf *M. smegmatis* (Grover N. *et al.*, 2014) und die Esterase TDMH auf verschiedenen *Mycobacterium*-Spezies (Yang Y. *et al.*, 2013) vergleichbare Beobachtung publizierten. Im Vergleich wies D29gp12 jedoch zumindest auf *M. smegmatis* eine deutlich höhere antimykobakterielle Aktivität als diese Enzyme auf. Allerdings war die antimykobakterielle Wirkung von D29gp12 bei den untersuchten Arten unterschiedlich, wobei die stärkste auf *M. smegmatis*, eine intermediäre auf *M. fortuitum* und die geringste, jedoch immer noch starke, auf *M. bovis* BCG beobachtet wurde. Folglich sollten zukünftige Studien die Untersuchung der antimykobakteriellen Aktivität auf ein möglichst breites Spektrum von *Mycobacterium*-Spezies ausweiten, um näher zu untersuchen, welche Unterschiede der Wirkung vorliegen und wodurch sie entstehen. Damit könnte nicht nur das Verständnis der Mechanismen der antimykobakteriellen Wirkung der Lysine A und B verbessert, sondern auch weitere Erkenntnisse über die Funktionen der unterschiedlichen Modifikationen der Oberfläche der *Mycobacterium*-Spezies erlangt werden.

Weiterhin ergaben die Resultate, dass mit den verwendeten Mykobakterienstämmen kein klarer synergistischer Effekt von Lysin A und Lysin B vorlag. Auf den TEM-Aufnahmen war allerdings erkennbar, dass die antimykobakterielle Wirkung des Lysins B zu einem Verlust des zytoplasmischen Materials ohne Lyse der Zellen führte, während die Inkubation mit der Mischung aus Lysin A und Lysin B eine massive Fragmentierung der Zellen erzeugte. Folglich wurde das Peptidoglykan durch die Lysin B-bedingte Destabilisierung der Mykomembran für das Lysin A zugänglich.

Um die Problematik der Überwindung der intakten Mykomembran zu lösen, wurde das Artilysin Konzept aufgegriffen. Die Ergebnisse auf *M. bovis* BCG zeigten dabei, dass eine Zugänglichkeit des Peptidoglykans durch die Fusion des Lysin A mit bestimmten AMPs erzeugt werden konnte, was die Anwendbarkeit des Artilysin Konzeptes auf Mykobakterien belegte. Daher ist zumindest für die Lysine A die Nutzung von Artilysinen als antimykobakterielle Wirkstoffe vielversprechend. In zukünftigen Studien sollten auch weitere, eventuell besser geeignete Peptide identifiziert und untersucht werden, um die Wirkung auf ein breiteres Spektrum mykobakterieller Arten zu verbessern. Auch für das Lysin B D29gp12 sollte, trotz der Eigenschaft ohne Modifikation von außen zu wirken, die Fusion mit AMPs weiter verfolgt werden, um potentiell eine noch stärkere Wirkung durch eine verbesserte Überwindung der Mykomembran zu erzeugen. Zudem könnten die für die Fusion verwendeten Peptide genutzt werden, um die Aufnahme in die eukaryotischen Zellen zu ermöglichen oder zu verbessern, was die Behandlung der hauptsächlich intrazellulär lebenden *Mycobacterium*-Arten drastisch erleichtern könnte.

Insgesamt sollten künftige Untersuchungen neben einer Testung weiterer Lysine und Peptide auch die Testung der antimykobakteriellen Aktivität auf intrazelluläre Mykobakterien einschließen. Ein weiterer Schwerpunkt sollte außerdem die Verringerung der Aggregationstendenz sowie gegebenenfalls die Erhöhung der Stabilität und die Steigerung der Ausbeute und Löslichkeit der Lysine sein, um eine Langzeitanwendung bei erhöhter Temperatur und die Verwendung höherer Proteinkonzentrationen und somit eine höhere Wirkstoffdosis bei der Anwendung zu ermöglichen. Dafür wäre auch die Koexpression der Lysine mit Chaperonen aus Mykobakteriophagen vielversprechend, da diese möglicherweise bereits als Faltungshelfer für die Lysine während der Expression in der Wirtszelle dienen.

Zusammenfassend ist mit dieser Arbeit durch die Charakterisierung der Lysine A Bx2gp11, D29gp10, TM4gp29, des Lysins B D29gp12 und der auf diesen Lysinen basierende Artily sine die nötige Grundlage gelegt worden, um neue Wirkstoffe gegen verschiedenste pathogene *Mycobacterium*-Spezies entwickeln zu können und dadurch nicht nur neue Therapieoptionen zu eröffnen, sondern auch die bestehende Diagnostik von Mykobakterien zu verbessern.

5. Referenzen

- Abdallah A. M., Gey van Pittius N. C., Champion P. A., Cox J., Luirink J., Vandenbroucke-Grauls C. M., Appelmek B. J. and Bitter W. (2007).** "Type VII secretion--mycobacteria show the way." *Nat Rev Microbiol* 5(11): 883-891.
- Alisky J., Iczkowski K., Rapoport A. and Troitsky N. (1998).** "Bacteriophages show promise as antimicrobial agents." *J Infect* 36(1): 5-15.
- Anton V., Rouge P. and Daffe M. (1996).** "Identification of the sugars involved in mycobacterial cell aggregation." *FEMS Microbiol Lett* 144(2-3): 167-170.
- Atanaskovic I., Bencherif A. C., Deyell M., Jaramillo-Riveri S., Benony M., Bernheim A. G., Libis V. K., Koutsoubelis N., Zegman Y., Lochner A. C., Basier C., Aghoghogbe I., Marinkovic Z. S., Zahra S., Toulouze M., Lindner A. B. and Wintermute E. H. (2014).** "In situ characterization of mycobacterial growth inhibition by lytic enzymes expressed in vectorized *E. coli*." *ACS Synth Biol* 3(12): 932-934.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (1987).** "Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York.
- Bagella L., Scocchi M. and Zanetti M. (1995).** "cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins." *FEBS Letters* 376(3): 225-228.
- Bahnsen J. S., Franzzyk H., Sayers E. J., Jones A. T. and Nielsen H. M. (2015).** "Cell-penetrating antimicrobial peptides - perspectives for targeting intracellular infections." *Pharm Res* 32(5): 1546-1556.
- Barry C. E., 3rd, Lee R. E., Mdluli K., Sampson A. E., Schroeder B. G., Slayden R. A. and Yuan Y. (1998).** "Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions." *Prog Lipid Res* 37(2-3): 143-179.
- Bassetti M., Merelli M., Temperoni C. and Astilean A. (2013).** "New antibiotics for bad bugs: where are we?" *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 12: 22.
- Bechara C. and Sagan S. (2013).** "Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?" *FEBS Letters* 587(12): 1693-1702.
- Brennan P. J. and Nikaido H. (1995).** "The envelope of mycobacteria." *Annu Rev Biochem* 64: 29-63.
- Briers Y. and Lavigne R. (2015).** "Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria." *Future Microbiol* 10(3): 377-390.
- Briers Y., Walmagh M., Grymonprez B., Biebl M., Pirnay J. P., Defraigne V., Michiels J., Cenens W., Aertsen A., Miller S. and Lavigne R. (2014a).** "Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* 58(7): 3774-3784.
- Briers Y., Walmagh M., Van Puyenbroeck V., Cornelissen A., Cenens W., Aertsen A., Oliveira H., Azeredo J., Verween G., Pirnay J. P., Miller S., Volckaert G. and Lavigne R. (2014b).** "Engineered endolysin-based "Artilylins" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens." *MBio* 5(4): e01379-01314.
- Calmette A. (1931).** "Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG." *Proc R Soc Med* 24(11): 1481-1490.
- Catalao M. J., Gil F., Moniz-Pereira J., Sao-Jose C. and Pimentel M. (2013).** "Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way." *FEMS Microbiol Rev* 37(4): 554-571.
- Cheng G., Hao H., Xie S., Wang X., Dai M., Huang L. and Yuan Z. (2014).** "Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?" *Front Microbiol* 5: 217.
- Cheng Q. and Fischetti V. (2007).** "Mutagenesis of a bacteriophage lytic enzyme PlyGBS significantly increases its antibacterial activity against group B streptococci." *Applied Microbiology and Biotechnology* 74(6): 1284-1291.
- Chun J., Kang S. O., Hah Y. C. and Goodfellow M. (1996).** "Phylogeny of mycolic acid-containing actinomycetes." *Journal of Industrial Microbiology* 17(3-4): 205-213.

- Coban A. Y., Akbal A. U., Uzun M. and Durupinar B. (2015).** "Evaluation of four colourimetric susceptibility tests for the rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates." *Mem Inst Oswaldo Cruz*.
- Cohen N. R., Lobritz M. A. and Collins J. J. (2013).** "Microbial persistence and the road to drug resistance." *Cell Host Microbe* 13(6): 632-642.
- Crick D. C., Mahapatra S. and Brennan P. J. (2001).** "Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*." *Glycobiology* 11(9): 107R-118R.
- d'Herelle F. (1917).** "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques." *CR Acad. Sci. Paris* 165: 373-375.
- Daffé M., Crick D. C. and Jackson M. (2014).** "Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids." *Microbiology Spectrum* 2(4).
- Dartois V. (2014).** "The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells." *Nat Rev Microbiol* 12(3): 159-167.
- David H. L., Clavel S. and Clement F. (1980).** "Adsorption and Growth of the Bacteriophage-D29 in Selected *Mycobacteria*." *Annales de l'Institut Pasteur / Virologie* 131(2): 167-184.
- Dheda K., Gumbo T., Gandhi N. R., Murray M., Theron G., Udwadia Z., Migliori G. B. and Warren R. (2014).** "Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis." *The Lancet Respiratory Medicine* 2(4): 321-338.
- Diel R., Vandeputte J., de Vries G., Stillo J., Wanlin M. and Nienhaus A. (2014).** "Costs of tuberculosis disease in the European Union: a systematic analysis and cost calculation." *Eur Respir J* 43(2): 554-565.
- Donovan D. M., Dong S., Garrett W., Rousseau G. M., Moineau S. and Pritchard D. G. (2006).** "Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities." *Appl Environ Microbiol* 72(4): 2988-2996.
- Dubos R. J. (1945).** "Rapid and Submerged Growth of *Mycobacteria* in Liquid Media." *Experimental Biology and Medicine* 58(4): 361-362.
- Dubos R. J. and Davis B. D. (1946).** "Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media." *J Exp Med* 83: 409-423.
- Dunne M., Mertens H. D., Garefalaki V., Jeffries C. M., Thompson A., Lemke E. A., Svergun D. I., Mayer M. J., Narbad A. and Meijers R. (2014).** "The CD27L and CTP1L endolysins targeting *Clostridia* contain a built-in trigger and release factor." *PLoS Pathog* 10(7): e1004228.
- Dutta N. K. and Karakousis P. C. (2014).** "Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms." *Microbiol Mol Biol Rev* 78(3): 343-371.
- Dworkin M. and Falkow S. (2006).** *The prokaryotes : a handbook on the biology of bacteria*. New York ; London, Springer.
- Engstrom A. (2015).** "Fighting an old disease with modern tools: characteristics and molecular detection methods of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Dis (Lond)*: 1-17.
- Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J. and Coffey A. (2010).** "Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials." *Bioeng Bugs* 1(1): 9-16.
- Filion M. (2012).** *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*. Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- Fischetti V. A. (2008).** "Bacteriophage lysins as effective antibacterials." *Curr Opin Microbiol* 11(5): 393-400.
- Fleming A. (1945).** "Penicillin." Nobel Lecture.
- Flynn J. L. and Chan J. (2003).** "Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy." *Current Opinion in Immunology* 15(4): 450-455.
- Fujita Y., Naka T., McNeil M. R. and Yano I. (2005).** "Intact molecular characterization of cord factor (trehalose 6,6'-dimycolate) from nine species of mycobacteria by MALDI-TOF mass spectrometry." *Microbiology* 151(10): 3403-3416.
- Garcia M., Pimentel M. and Moniz-Pereira J. (2002).** "Expression of *Mycobacteriophage* Ms6 lysis genes is driven by two sigma(70)-like promoters and is dependent on a transcription termination signal present in the leader RNA." *J Bacteriol* 184(11): 3034-3043.

- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R. D. and Bairoch A. (2003).** "ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." *Nucleic Acids Res* 31(13): 3784-3788.
- Gil F., Catalao M. J., Moniz-Pereira J., Leandro P., McNeil M. and Pimentel M. (2008).** "The lytic cassette of mycobacteriophage Ms6 encodes an enzyme with lipolytic activity." *Microbiology* 154(Pt 5): 1364-1371.
- Gil F., Grzegorzewicz A. E., Catalao M. J., Vital J., McNeil M. R. and Pimentel M. (2010).** "Mycobacteriophage Ms6 LysB specifically targets the outer membrane of *Mycobacterium smegmatis*." *Microbiology* 156(Pt 5): 1497-1504.
- Gilham D. and Lehner R. (2005).** "Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro." *Methods* 36(2): 139-147.
- Gilmer D. B., Schmitz J. E., Euler C. W. and Fischetti V. A. (2013).** "Novel Bacteriophage Lysin with Broad Lytic Activity Protects against Mixed Infection by *Streptococcus pyogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(6): 2743-2750.
- Goldman E. and Green L. H. (2008).** *Practical Handbook of Microbiology*, Second Edition, CRC Press.
- Gordon R. E. and Barnett D. A. (1977).** "Resistance to Rifampin and Lysozyme of Strains of Some Species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a Taxonomic Tool." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 27(3): 176-178.
- Goren M. B., Cernich M. and Brokl O. (1978).** "Some Observations on Mycobacterial Acid-Fastness." *American Review of Respiratory Disease* 118(1): 151-154.
- Grover N., Paskaleva E. E., Mehta K. K., Dordick J. S. and Kane R. S. (2014).** "Growth inhibition of *Mycobacterium smegmatis* by mycobacteriophage-derived enzymes." *Enzyme Microb Technol* 63: 1-6.
- Gutierrez D., Ruas-Madiedo P., Martinez B., Rodriguez A. and Garcia P. (2014).** "Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5." *PLoS One* 9(9): e107307.
- Hall-Stoodley L., Costerton J. W. and Stoodley P. (2004).** "Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases." *Nat Rev Micro* 2(2): 95-108.
- Hammond R. J., Baron V. O., Oravcova K., Lipworth S. and Gillespie S. H. (2015).** "Phenotypic resistance in mycobacteria: is it because I am old or fat that I resist you?" *J Antimicrob Chemother.*
- Hanahan D. (1983).** "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hanson C., Sotgiu G. and Loddenkemper R. (2014).** "Ensuring that the diagnosis of tuberculosis accelerates progress towards the Millennium Development Goals." *Eur Respir J* 44(1): 1-4.
- Hatfull G. F. (2014a).** "Molecular Genetics of Mycobacteriophages." *Microbiol Spectr* 2(2): 1-36.
- Hatfull G. F. (2014b).** "Mycobacteriophages: windows into tuberculosis." *PLoS Pathog* 10(3): e1003953.
- Henrichsen J. (1972).** "Bacterial surface translocation: a survey and a classification." *Bacteriol Rev* 36(4): 478-503.
- Henry M., Begley M., Neve H., Maher F., Ross R. P., McAuliffe O., Coffey A. and O'Mahony J. M. (2010).** "Cloning and expression of a mureinolytic enzyme from the mycobacteriophage TM4." *FEMS Microbiol Lett* 311(2): 126-132.
- Hett E. C. and Rubin E. J. (2008).** "Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective." *Microbiol Mol Biol Rev* 72(1): 126-156, table of contents.
- Hoffmann C., Leis A., Niederweis M., Plitzko J. M. and Engelhardt H. (2008).** "Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(10): 3963-3967.
- Horsburgh C. R., Barry C. E. and Lange C. (2015).** "Treatment of Tuberculosis." *New England Journal of Medicine* 373(22): 2149-2160.
- Hou L., Hao L., Qi J. and Yang G. (2010).** "[Expression and purification of lysin B in mycobacteriophage D29 and analysis of its enzymatic properties]." *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 26(4): 517-522.
- Inoue H., Nojima H. and Okayama H. (1990).** "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* 96(1): 23-28.

- International Committee on Taxonomy of Viruses and King A. M. Q. (2012).** Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London ; Waltham, MA, Academic Press.
- Jacob E. and Unger R. (2007).** "A tale of two tails: why are terminal residues of proteins exposed?" *Bioinformatics* 23(2): e225-e230.
- Jacobs-Sera D., Marinelli L. J., Bowman C., Broussard G. W., Guerrero Bustamante C., Boyle M. M., Petrova Z. O., Dedrick R. M., Pope W. H., Science Education Alliance Phage Hunters Advancing G., Evolutionary Science Sea-Phages P., Modlin R. L., Hendrix R. W. and Hatfull G. F. (2012).** "On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference." *Virology* 434(2): 187-201.
- Jagielski T., van Ingen J., Rastogi N., Dziadek J., Mazur P. K. and Bielecki J. (2014).** "Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria." *Biomed Res Int* 2014: 645802.
- Jankute M., Cox J. A., Harrison J. and Besra G. S. (2015).** "Assembly of the Mycobacterial Cell Wall." *Annu Rev Microbiol* 69: 405-423.
- Jarlier V. and Nikaido H. (1994).** "Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics." *FEMS Microbiol Lett* 123(1-2): 11-18.
- Jensen H. B. and Kleppe K. (1972).** "Studies on T4 lysozyme. Affinity for chitin and the use of chitin in the purification of the enzyme." *Eur J Biochem* 26(3): 305-312.
- Johnson W. C., Jr. (1990).** "Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide." *Proteins* 7(3): 205-214.
- Kanetsuna F. (1980).** "Effect of lysozyme on mycobacteria." *Microbiol Immunol* 24(12): 1151-1162.
- Kaser M., Ruf M. T., Hauser J., Marsollier L. and Pluschke G. (2009).** "Optimized method for preparation of DNA from pathogenic and environmental mycobacteria." *Appl Environ Microbiol* 75(2): 414-418.
- Keen E. C. (2012).** "Phage therapy: concept to cure." *Front Microbiol* 3: 238.
- Khara J. S., Lim F. K., Wang Y., Ke X. Y., Voo Z. X., Yang Y. Y., Lakshminarayanan R. and Ee P. L. (2015).** "Designing alpha-helical peptides with enhanced synergism and selectivity against *Mycobacterium smegmatis*: Discerning the role of hydrophobicity and helicity." *Acta Biomater.*
- Kieser K. J. and Rubin E. J. (2014).** "How sisters grow apart: mycobacterial growth and division." *Nat Rev Microbiol* 12(8): 550-562.
- King J. and Laemmli U. K. (1971).** "Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4." *Journal of Molecular Biology* 62(3): 465-477.
- Kotani S., Yanagida I., Kato K. and Matsuda T. (1970).** "Studies on peptides, glycopeptides and antigenic polysaccharide-glycopeptide complexes isolated from an L-11 enzyme lysate of the cell walls of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv." *Biken J* 13(4): 249-275.
- Kretzer J. W., Lehmann R., Schmelcher M., Banz M., Kim K. P., Korn C. and Loessner M. J. (2007).** "Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells." *Appl Environ Microbiol* 73(6): 1992-2000.
- Kumar P., Arora K., Lloyd J. R., Lee I. Y., Nair V., Fischer E., Boshoff H. I. and Barry C. E., 3rd (2012).** "Meropenem inhibits D,D-carboxypeptidase activity in *Mycobacterium tuberculosis*." *Mol Microbiol* 86(2): 367-381.
- Labrie S. J., Samson J. E. and Moineau S. (2010).** "Bacteriophage resistance mechanisms." *Nat Rev Microbiol* 8(5): 317-327.
- Laemmli U. K. (1970).** "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lai M. J., Liu C. C., Jiang S. J., Soo P. C., Tu M. H., Lee J. J., Chen Y. H. and Chang K. C. (2015).** "Antimycobacterial Activities of Endolysins Derived From a Mycobacteriophage, BTCU-1." *Molecules* 20(10): 19277-19290.
- Lavollay M., Arthur M., Fourgeaud M., Dubost L., Marie A., Veziris N., Blanot D., Gutmann L. and Mainardi J. L. (2008).** "The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation." *J Bacteriol* 190(12): 4360-4366.

- Lehmann K. B. and Neumann R. O. (1896).** Atlas und grundriss der bakteriologie und lehrbuch der speziellen bakteriologischen diagnostik. München,, J. F. Lehmann.
- Liu J., Barry C. E., 3rd, Besra G. S. and Nikaido H. (1996).** "Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall." *J Biol Chem* 271(47): 29545-29551.
- Loessner M. J. (2005).** "Bacteriophage endolysins--current state of research and applications." *Curr Opin Microbiol* 8(4): 480-487.
- Loessner M. J., Gaeng S., Wendlinger G., Maier S. K. and Scherer S. (1998).** "The two-component lysis system of Staphylococcus aureus bacteriophage Twort: a large TTG-start holin and an associated amidase endolysin." *FEMS Microbiology Letters* 162(2): 265-274.
- Loessner M. J., Kramer K., Ebel F. and Scherer S. (2002).** "C-terminal domains of Listeria monocytogenes bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates." *Mol Microbiol* 44(2): 335-349.
- Lood R., Raz A., Molina H., Euler C. W. and Fischetti V. A. (2014).** "A Highly Active and Negatively Charged Streptococcus pyogenes Lysin with a Rare d-Alanyl-L-Alanine Endopeptidase Activity Protects Mice against Streptococcal Bacteremia." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(6): 3073-3084.
- Low L. Y., Yang C., Perego M., Osterman A. and Liddington R. (2011).** "Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins." *J Biol Chem* 286(39): 34391-34403.
- Low L. Y., Yang C., Perego M., Osterman A. and Liddington R. C. (2005).** "Structure and Lytic Activity of a Bacillus anthracis Prophage Endolysin." *Journal of Biological Chemistry* 280(42): 35433-35439.
- Madigan M. T. and Brock T. D. (2013).** Brock Mikrobiologie. München u.a., Pearson.
- Mahapatra S., Crick D. C., McNeil M. R. and Brennan P. J. (2008).** "Unique structural features of the peptidoglycan of Mycobacterium leprae." *J Bacteriol* 190(2): 655-661.
- Mahapatra S., Piechota C., Gil F., Ma Y., Huang H., Scherman M. S., Jones V., Pavelka M. S., Jr., Moniz-Pereira J., Pimentel M., McNeil M. R. and Crick D. C. (2013).** "Mycobacteriophage Ms6 LysA: a peptidoglycan amidase and a useful analytical tool." *Appl Environ Microbiol* 79(3): 768-773.
- Mahapatra S., Scherman H., Brennan P. J. and Crick D. C. (2005a).** "N Glycolylation of the nucleotide precursors of peptidoglycan biosynthesis of Mycobacterium spp. is altered by drug treatment." *J Bacteriol* 187(7): 2341-2347.
- Mahapatra S., Yagi T., Belisle J. T., Espinosa B. J., Hill P. J., McNeil M. R., Brennan P. J. and Crick D. C. (2005b).** "Mycobacterial lipid II is composed of a complex mixture of modified muramyl and peptide moieties linked to decaprenyl phosphate." *J Bacteriol* 187(8): 2747-2757.
- Mao J., Schmelcher M., Harty W. J., Foster-Frey J. and Donovan D. M. (2013).** "Chimeric Ply187 endolysin kills Staphylococcus aureus more effectively than the parental enzyme." *FEMS Microbiol Lett* 342(1): 30-36.
- Marrakchi H., Laneelle M. A. and Daffe M. (2014).** "Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond." *Chem Biol* 21(1): 67-85.
- Martinez A., Torello S. and Kolter R. (1999).** "Sliding motility in mycobacteria." *J Bacteriol* 181(23): 7331-7338.
- Mayer M. J., Garefalaki V., Spoerl R., Narbad A. and Meijers R. (2011).** "Structure-based modification of a Clostridium difficile-targeting endolysin affects activity and host range." *J Bacteriol* 193(19): 5477-5486.
- McNeil M., Daffe M. and Brennan P. J. (1990).** "Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls." *J Biol Chem* 265(30): 18200-18206.
- McNicholas S., Potterton E., Wilson K. S. and Noble M. E. (2011).** "Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67(Pt 4): 386-394.
- Misaki A., Seto N. and Azuma I. (1974).** "Structure and immunological properties of D-arabino-D-galactans isolated from cell walls of Mycobacterium species." *J Biochem* 76(1): 15-27.
- Monterroso B., Sáiz J. L., García P., García J. L. and Menéndez M. (2008).** "Insights into the Structure-Function Relationships of Pneumococcal Cell Wall Lysozymes, LytC and Cpl-1." *Journal of Biological Chemistry* 283(42): 28618-28628.
- Mullis K. B. and Faloona F. A. (1987).** "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* 155: 335-350.

- Nelson D. C., Schmelcher M., Rodriguez-Rubio L., Klumpp J., Pritchard D. G., Dong S. and Donovan D. M. (2012).** "Endolysins as antimicrobials." *Adv Virus Res* 83: 299-365.
- Niesen F. H., Berglund H. and Vedadi M. (2007).** "The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability." *Nat Protoc* 2(9): 2212-2221.
- Nobrega F. L., Costa A. R., Kluskens L. D. and Azeredo J. (2015).** "Revisiting phage therapy: new applications for old resources." *Trends Microbiol* 23(4): 185-191.
- Nocker A., Cheung C.-Y. and Camper A. K. (2006).** "Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells." *Journal of Microbiological Methods* 67(2): 310-320.
- Pace C. N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G. and Gray T. (1995).** "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." *Protein Sci* 4(11): 2411-2423.
- Pai M. (2015).** "Transforming the diagnosis of tuberculosis: an editorial board member's opinion at the 15th year of Expert Review of Molecular Diagnostics." *Expert Review of Molecular Diagnostics* 15(3): 295-298.
- Pai M. and Schito M. (2015).** "Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects." *J Infect Dis* 211 Suppl 2: S21-28.
- Pastagia M., Schuch R., Fischetti V. A. and Huang D. B. (2013).** "Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives." *J Med Microbiol* 62(Pt 10): 1506-1516.
- Patru M.-M. and Pavelka M. S. (2010).** "A Role for the Class A Penicillin-Binding Protein PonA2 in the Survival of *Mycobacterium smegmatis* under Conditions of Nonreplication." *Journal of Bacteriology* 192(12): 3043-3054.
- Payne K., Sun Q., Sacchettini J. and Hatfull G. F. (2009).** "Mycobacteriophage Lysin B is a novel mycolylarabinogalactan esterase." *Mol Microbiol* 73(3): 367-381.
- Payne K. M. and Hatfull G. F. (2012).** "Mycobacteriophage endolysins: diverse and modular enzymes with multiple catalytic activities." *PLoS One* 7(3): e34052.
- Penchovsky R. and Traykovska M. (2015).** "Designing drugs that overcome antibacterial resistance: where do we stand and what should we do?" *Expert Opin Drug Discov* 10(6): 631-650.
- Pesch K. L. and Simmert U. (1929).** "Combined assays for lactose and galactose by enzymtic reactions." *Milchw. Forsch.*(8: 551).
- Pires D. E., Ascher D. B. and Blundell T. L. (2014a).** "DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach." *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue): W314-319.
- Pires D. E., Ascher D. B. and Blundell T. L. (2014b).** "mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures." *Bioinformatics* 30(3): 335-342.
- Pohane A. A., Joshi H. and Jain V. (2014).** "Molecular dissection of phage endolysin: an interdomain interaction confers host specificity in Lysin A of *Mycobacterium* phage D29." *J Biol Chem* 289(17): 12085-12095.
- Pope W. H., Bowman C. A., Russell D. A., Jacobs-Sera D., Asai D. J., Cresawn S. G., Jacobs W. R., Hendrix R. W., Lawrence J. G., Hatfull G. F., Science Education Alliance Phage Hunters Advancing G., Evolutionary S., Phage Hunters Integrating R., Education and Mycobacterial Genetics C. (2015).** "Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity." *Elife* 4: e06416.
- Rachel R., Meyer C., Klingl A., Gürster S., Heimerl T., Wasserburger N., Burghardt T., Küper U., Bellack A., Schopf S., Wirth R., Huber H. and Wanner G. (2010).** "Analysis of the Ultrastructure of Archaea by Electron Microscopy." 96: 47-69.
- Radomski N., Kreitmann L., McIntosh F. and Behr M. A. (2013).** "The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues." *PLoS One* 8(10): e78749.
- Rao M., Streur T. L., Aldwell F. E. and Cook G. M. (2001).** "Intracellular pH regulation by *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium bovis* BCG." *Microbiology* 147(Pt 4): 1017-1024.
- Rastogi N., Legrand E. and Sola C. (2001).** "The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis." *Rev Sci Tech* 20(1): 21-54.

- Raymond J. B., Mahapatra S., Crick D. C. and Pavelka M. S., Jr. (2005).** "Identification of the *namH* gene, encoding the hydroxylase responsible for the N-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan." *J Biol Chem* 280(1): 326-333.
- Recht J. and Kolter R. (2001).** "Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*." *J Bacteriol* 183(19): 5718-5724.
- Robert-Koch-Institut (2013).** "Tuberkulose: RKI-Ratgeber für Ärzte."
- Rodriguez Plaza J. G., Morales-Nava R., Diener C., Schreiber G., Gonzalez Z. D., Lara Ortiz M. T., Ortega Blake I., Pantoja O., Volkmer R., Klipp E., Herrmann A. and Del Rio G. (2014).** "Cell penetrating peptides and cationic antibacterial peptides: two sides of the same coin." *J Biol Chem* 289(21): 14448-14457.
- Rogall T., Wolters J., Flohr T. and Bottger E. C. (1990).** "Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*." *Int J Syst Bacteriol* 40(4): 323-330.
- Rook G. A., Dheda K. and Zumla A. (2005).** "Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines." *Nat Rev Immunol* 5(8): 661-667.
- Rosenberg A. H., Lade B. N., Chui D. S., Lin S. W., Dunn J. J. and Studier F. W. (1987).** "Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase." *Gene* 56(1): 125-135.
- Rybníček J., Kramme S. and Small P. L. (2006).** "Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*--application for identification and susceptibility testing." *J Med Microbiol* 55(Pt 1): 37-42.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Erlich H. A. (1988).** "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-491.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989).** *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander P., Meier A. and Bottger E. C. (1996).** "Ribosomal drug resistance in mycobacteria." *Res Microbiol* 147(1-2): 59-67.
- Sani M., Houben E. N., Geurtsen J., Pierson J., de Punder K., van Zon M., Wever B., Piersma S. R., Jimenez C. R., Daffe M., Appelmelk B. J., Bitter W., van der Wel N. and Peters P. J. (2010).** "Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins." *PLoS Pathog* 6(3): e1000794.
- Santos R., de Carvalho C. C., Stevenson A., Grant I. R. and Hallsworth J. E. (2015).** "Extraordinary solute-stress tolerance contributes to the environmental tenacity of mycobacteria." *Environ Microbiol Rep*.
- Schleifer K. H. and Kandler O. (1972).** "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications." *Bacteriol Rev* 36(4): 407-477.
- Schmelcher M., Donovan D. M. and Loessner M. J. (2012).** "Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials." *Future Microbiol* 7(10): 1147-1171.
- Schmelcher M., Tchang V. S. and Loessner M. J. (2011).** "Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity." *Microb Biotechnol* 4(5): 651-662.
- Schmitt J., Hess H. and Stunnenberg H. (1993).** "Affinity purification of histidine-tagged proteins." *Molecular Biology Reports* 18(3): 223-230.
- Sharma A., Pohane A. A., Bansal S., Bajaj A., Jain V. and Srivastava A. (2015).** "Cell penetrating synthetic antimicrobial peptides (SAMPs) exhibiting potent and selective killing of mycobacterium by targeting its DNA." *Chemistry* 21(9): 3540-3545.
- Sharp P. A., Sugden B. and Sambrook J. (1973).** "Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose--ethidium bromide electrophoresis." *Biochemistry* 12(16): 3055-3063.
- Shen Y., Koller T., Kreikemeyer B. and Nelson D. C. (2013).** "Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(8): 1818-1824.
- Shiloh M. U. and Champion P. A. (2010).** "To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis?" *Curr Opin Microbiol* 13(1): 86-92.

- Skurnik M. and Strauch E. (2006).** "Phage therapy: facts and fiction." *Int J Med Microbiol* 296(1): 5-14.
- Smeulders M. J., Keer J., Speight R. A. and Williams H. D. (1999).** "Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase." *J Bacteriol* 181(1): 270-283.
- Smith R. L., Tauer L. W., Sanderson M. W. and Grohn Y. T. (2014).** "Minimum cost to control bovine tuberculosis in cow-calf herds." *Prev Vet Med* 115(1-2): 18-28.
- Splith K. and Neundorff I. (2011).** "Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa." *Eur Biophys J* 40(4): 387-397.
- Stahl D. A. and Urbance J. W. (1990).** "The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria." *J Bacteriol* 172(1): 116-124.
- Stark G. R. (1965).** "Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups." *Biochemistry* 4(6): 1030-1036.
- Studier F. W. and Moffatt B. A. (1986).** "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* 189(1): 113-130.
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J. and Dubendorff J. W. (1990).** "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185: 60-89.
- Sturino J. M. and Klaenhammer T. R. (2006).** "Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing." *Nat Rev Micro* 4(5): 395-404.
- Swift B. M., Gerrard Z. E., Huxley J. N. and Rees C. E. (2014).** "Factors affecting phage D29 infection: a tool to investigate different growth states of mycobacteria." *PLoS One* 9(9): e106690.
- Takayama K., Wang C. and Besra G. S. (2005).** "Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*." *Clin Microbiol Rev* 18(1): 81-101.
- Taneja N. K. and Tyagi J. S. (2007).** "Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*." *J Antimicrob Chemother* 60(2): 288-293.
- Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Bottger E. C. and Bodmer T. (1993).** "Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis." *J Clin Microbiol* 31(2): 175-178.
- Teng T., Liu J. and Wei H. (2015).** "Anti-mycobacterial peptides: from human to phage." *Cell Physiol Biochem* 35(2): 452-466.
- Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (1979).** "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Tripathi D., Chandra H. and Bhatnagar R. (2013).** "Poly-L-glutamate/glutamine synthesis in the cell wall of *Mycobacterium bovis* is regulated in response to nitrogen availability." *BMC Microbiol* 13: 226.
- Vaara M. (1992).** "Agents that increase the permeability of the outer membrane." *Microbiol Rev* 56(3): 395-411.
- Van Acker H., Van Dijck P. and Coenye T. (2014).** "Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms." *Trends in Microbiology* 22(6): 326-333.
- Velayati A. A., Farnia P., Ibrahim T. A., Haroun R. Z., Kuan H. O., Ghanavi J., Farnia P., Kabarei A. N., Tabarsi P., Omar A. R., Varahram M. and Masjedi M. R. (2009).** "Differences in cell wall thickness between resistant and nonresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*: using transmission electron microscopy." *Chemotherapy* 55(5): 303-307.
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F. and van Sinderen D. (2007).** "Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum." *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3): 495-548.
- Veyrier F., Pletzer D., Turenne C. and Behr M. A. (2009).** "Phylogenetic detection of horizontal gene transfer during the step-wise genesis of *Mycobacterium tuberculosis*." *BMC Evol Biol* 9: 196.
- Vollmer W. (2008).** "Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan." *FEMS Microbiol Rev* 32(2): 287-306.
- Watanabe M., Aoyagi Y., Ridell M. and Minnikin D. E. (2001).** "Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria." *Microbiology* 147(Pt 7): 1825-1837.

- Wells J. A. (1990).** "Additivity of mutational effects in proteins." *Biochemistry* 29(37): 8509-8517.
- Williams-Bouyer N., Yorke R., Lee H. I. and Woods G. L. (2000).** "Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP Culture System II for Growth and Detection of Mycobacteria." *Journal of Clinical Microbiology* 38(11): 4167-4170.
- Wilson G. G. and Murray N. E. (1991).** "Restriction and modification systems." *Annu Rev Genet* 25: 585-627.
- World Health Organization (2014).** Antimicrobial resistance : Global report on surveillance. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- World Health Organization (2015).** Global tuberculosis report. Geneva, Switzerland, World Health Organization.
- Xiong X., Zhang H. M., Wu T. T., Xu L., Gan Y. L., Jiang L. S., Zhang L. and Guo S. L. (2014).** "Titer dynamic analysis of D29 within MTB-infected macrophages and effect on immune function of macrophages." *Exp Lung Res* 40(2): 86-98.
- Yang Y., Bhatti A., Ke D., Gonzalez-Juarrero M., Lenaerts A., Kremer L., Guerardel Y., Zhang P. and Ojha A. K. (2013).** "Exposure to a cutinase-like serine esterase triggers rapid lysis of multiple mycobacterial species." *J Biol Chem* 288(1): 382-392.
- Yuan Y., Lee R. E., Besra G. S., Belisle J. T. and Barry C. E., 3rd (1995).** "Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14): 6630-6634.
- Zourob M., Elwary S. and Turner A. P. F. (2008).** *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems: Biosensors, Recognition Receptors, and Microsystems*, Springer.
- Zuber B., Chami M., Houssin C., Dubochet J., Griffiths G. and Daffe M. (2008).** "Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state." *J Bacteriol* 190(16): 5672-5680.

6. Anhang

Anhang 1: Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Chemikalie	Firma	Artikel-nummer
4-Nitrophenyl Acetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	N8130
4-Nitrophenyl Dodecanoat, =98.0% (GC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	61716-1G
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	6368.1
Agarose NEEO-Ultraqualität Roti®garose	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	2267.2
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	K029.1
Antikörper Kaninchen Anti-HIS Tag	antibodies-online GmbH (Aachen)	ABIN195461
Antikörper Ziege Anti-Kaninchen-IgG AK AP-Konjugat	antibodies-online GmbH (Aachen)	ABIN964983
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)	214030
Bacto Tryptone	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)	211699
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)	212730
Bacto-Hefeextrakt	Otto Nordwald GmbH [Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)]	212730
BSA, Molecular Biology Grade	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	B9000S
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	3886.2
CutSmart® Buffer	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	B7204S
dATP Solution	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	N0440S
DMSO 100%	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	-
DTT	AppliChem GmbH (Darmstadt)	A1101,0025
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	8043.2
Ethidiumbromidlösung 0,025% i. d.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	HP47.1
Gel Loading Dye, Blue (6X)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	B7021S
Glycerin 86%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	4043.3
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	HN78.3
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	X998.4
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	CN08.3
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	2189.2
Mangan (II)-chlorid-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	T881.2
MES monohydrate	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	6066.3
Methanol > 99,9% p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	4627.4
Middlebrook 7H9 Broth (Difco)	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)	271310
Milchpulver Blotting-Grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	T145
MOPS	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	6979.4
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	3957.2
Natronlauge 32%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	T196.1
Nickel(II)-sulfat - Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	T111.1
peqGOLD dNTP-Mix	peqlab [VWR International GmbH (Erlangen)]	20-3010
Phusion® GC Buffer Pack	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	B0519S
Phusion® HF Buffer	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	B0518S
p-Nitrotetrazoliumblauchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	4421.2
Resazurin sodium salt, powder, BioReagent, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	R7017
Roti®-Blue	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	A152.1
Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	K 929.1
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	3060.2
Salzsäure 6M	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	0281.1
SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	S-8830
SYPRO® Orange Protein Gel Stain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	S5692
β-mercaptoethanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)	A1108

T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)	B0202S
Rotiphorese® 10x TBE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	3061.2
Technical Buffer pH 10,01	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim)	108 805
Technical Buffer pH 4,01	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim)	108 800
Technical Buffer pH 7,00	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (Weilheim)	108 802
TRIS Ultra Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	5429.3
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	X100
TWEEN® 80, proteomics grade	AMRESCO LLC (Solon, USA)	M126

Verbrauchsmaterialien	Firma	Artikel-nummer
4titutde Frame Star 384	4titude Limited (Surrey, UK)	4ti-0384
4titutde Q PCR Adhesive Clear Seals	4titude Limited (Surrey, UK)	4ti-0560
96-Well-Platte, PP, 2,2 ml	VWR International GmbH (Erlangen)	732-0585
Abdeckplatte mit Kondensationsringen, PS, hohes Profil (9 mm), transp., steril, einzeln verpackt	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)	656171
BBL™ MGIT™ Mycobacteria Growth Indicator Tube 7 mL	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)	-
Corning® 96 Well Clear Flat Bottom Ultra Low Attachment Microplate, Individually Wrapped, with Lid, Sterile	Corning Inc. (New York, USA)	3474
Deckgläser, quadratisch und rechteckig	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	H873
Filtropur S 0,2µm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	83.1826.001
Filtropur S 0,45µm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	83.1826
Grade 3MM Chr Cellulose Chromatography Papers	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg)	
Impfeschlinge 10 µl steril	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	861562010
Küvetten Halb-Mikro	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	67.742
Küvetten Reinigungsmittel Hellmanex® II	Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim)	
Küvetten-UV Plastibrand Kunststoff	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	Y200.1
Luer-Lock Omnifix® Einmalspritzen 1 ml, 3 ml, 20 ml und 50 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	
Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden, transp., steril, 2 St./BTL.	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)	655161
Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel Any kD, 12-well, 20µl, 10	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, USA)	456-9035
Petrischalen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	82.1473
Pipettenspitzen 20 µl und 5ml ohne Filter und 10 µl, 100 µl, 200µl und 1000µl ohne Filter und mit Filter	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	
Pipettenspitzen mit Filter 100 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	70760412
Plattierungsspatel steril	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	86.1569.005
PVDF Blotting-Membran 0.45 µm 0.3 x 3.0 m	peqlab [VWR International GmbH (Erlangen)]	39-3010
Reagenzreservoirs, PS, 25ml	VWR International GmbH (Erlangen)	613-1174
Reagiergefäß 1,5 ml und 2,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	
Schraubröhre 15 ml, 50 ml und 50ml konisch	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	
Serologische Pipetten 10 ml und 25 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)	
Silikon-Schwammstopfen	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg)	2-4259
Standard-Objektträger, geschnitten	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	0656
ZelluTrans/Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe) Dialysiermembranen T2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)	E670.1

Tabelle A 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Anhang 2: Sequenzen und Beschreibung ausgewählter Primer

Sequenzen und Beschreibungen ausgewählter Primer sind im Folgenden tabellarisch dargestellt:

Bezeichnung	Beschreibung	Nukleotidsequenz
Bxz2gp11-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins Bxz2gp11 mit C-terminalem His-Tag®	5'-TATATA <u>CATATG</u> ACCGAGAAAGTGCTGCC-3'
Bxz2gp11-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> GTGGTGATGGTGATGGTGTTTTCACCGTACGGTTCAGCAGG-3'
Bxz2gp11 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins Bxz2gp11	5'- <u>CTCGAG</u> GTTTTCACCGTACGGTTCAGCAGG-3'
Bxz2gp11 noCBD for	Insertion von zwei STOP Codons und folgend einer XhoI Schnittstelle vor der Sequenz der Zellwand-Bindedomäne per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-TGATGAACCCGCTCTTTTATGGCC-3'
Bxz2gp11 noCBD rev		5'- <u>CTCGAG</u> TGGGCCTTTTTTCATAATCTCG-3'
Bxz2gp12-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins Bxz2gp12 mit C-terminalem His-Tag®	5'-TATATA <u>CATATG</u> CCGCTGCGTGTTGGCAG-3'
Bxz2gp12-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> GTGATGGTGGTGGTGGTGGGAGCGCAGGAAATCGATGGCTGGA-3'
Bxz2gp12 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins Bxz2gp12	5'- <u>CTCGAG</u> GGAGCGCAGGAAATCGATGGCTGGA-3'
D29gp10-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins D29gp10 mit C-terminalem His-Tag®	5'-TATATA <u>CATATG</u> ACCCTGATCGTACCCG-3'
D29gp10-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTGGAGTGCACCGTTACGGGCAATGTAG-3'
D29gp10 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins D29gp10	5'- <u>CTCGAG</u> GAGTGCACCGTTACGGGCAATGTAG-3'
D29gp10 noCBD for	Insertion von zwei STOP Codons und folgend einer XhoI Schnittstelle vor der Sequenz der Zellwand-Bindedomäne per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-TGATGAAGCCCGTACGGTGATCCG-3'
D29gp10 noCBD rev		5'- <u>CTCGAG</u> CTGGGTCACTACGGTGTG-3'
D29gp12-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins D29gp12 mit C-terminalem His-Tag®	5'-GAGATA <u>CATATG</u> AGCAAACCTGGCTGTT-3'
D29gp12-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTGGATCTGACGCAGAACTCAACTGCT-3'
D29gp12 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins D29gp12	5'- <u>CTCGAG</u> GATCTGACGCAGAACTCAACTGCT-3'
L5gp10-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins L5gp10 mit C-terminalem His-Tag®	5'-GAGATA <u>CATATG</u> ACCTTCACTGTTACCCG-3'
L5gp10-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> GTGGTGGTGATGGTGGTGAGACACCACGCTCAGCAATGTAA-3'
L5gp10 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins L5gp10	5'- <u>CTCGAG</u> CAGACCACACGCTCAGCAATGTAA-3'
L5gp12-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins L5gp12 mit C-terminalem His-Tag®	5'-GATATA <u>CATATG</u> AGCAAACCTGGCTGTT-3'
L5gp12-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> GTGATGGTGGTGGTGGATACGACGCAGAACTCGACTGCT-3'
L5gp12 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins L5gp12	5'- <u>CTCGAG</u> GATACGACGCAGAACTCGACTGCT-3'
TM4gp29-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins TM4gp29 mit C-terminalem His-Tag®	5'-TATATA <u>CATATG</u> AGCTTCACTCGCTTCTGCAGG-3'
TM4gp29-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTGTGCAGCACCGCCGTCAGTTGCCGCA-3'
TM4gp29 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins TM4gp29	5'- <u>CTCGAG</u> TGCAGCACCGCCGTCAGTTGCCGCA-3'
TM4gp29 noCBD for	Insertion von zwei STOP Codons und folgend einer XhoI Schnittstelle vor der Sequenz der Zellwand-Bindedomäne per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-TGATGATCTCGCTCTCCGTTCCGT-3'
TM4gp29 noCBD rev		5'- <u>CTCGAG</u> TACAAAACGGCGATCTGCC-3'
TM4gp30-His-Tag® for	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins TM4gp30 mit C-terminalem His-Tag®	5'-TATATA <u>CATATG</u> GCTTGGGTGGGTGGCA-3'
TM4gp30-His-Tag® rev		5'-TATATA <u>CTCGAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTGTGCGGCACGTGCAGCAACAGAGGCA-3'
TM4gp30 noHis-Tag® rev	Amplifikation der Nukleotidsequenz des Endolysins TM4gp30	5'- <u>CTCGAG</u> TGCGGCACGTGCAGCAACAGAGGCA-3'

LL-37-D29gp12-His-Tag® for1	Erste PCR Reaktion zur Insertion der Sequenz des Peptides LL-37 und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CCTGGTTCCGCTACCGAATCT <u>GGATCC</u> ATGAGCAAACCGTGGCTG-3'
LL-37-D29gp12-His-Tag® rev1		5'-TTACGCAGAAAGTCTTTAATGCGCTGCAC <u>CATATG</u> TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC-3'
LL-37-D29gp12-His-Tag® for2	Zweite PCR Reaktion zur Insertion der Sequenz des Peptides LL-37 und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-GAGAAAATCGGCAAAGAGTTCAAACGTATCGTGCAGCGCATTAAGAC-3'
LL-37-D29gp12-His-Tag® rev2		5'-TTTGGATTTGCGAAAGAAGTCACCCAGGAG CATATG TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC-3'
D29gp12-His-Tag®-LL-37 for1	Erste PCR Reaktion zur Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides LL-37 vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CTTCTTTCGCAATCCAAAGAGAAAATCGGCAAA <u>CTCGAG</u> TGATGAGATCCG-3'
D29gp12-His-Tag®-LL-37 rev1		5'-TCACCCAGGAG <u>CTTAAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTGATCTGACGCAGAAACTC-3'
D29gp12-His-Tag®-LL-37 for2	Zweite PCR Reaktion zur Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides LL-37 vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-TCTGCGTAACCTGGTTCGCGTACCGAATCTTAG <u>CTCGAG</u> TGATGAGATCCG-3'
D29gp12-His-Tag®-LL-37 rev2		5'-AAGTCTTTAATGCGCTGCACGATACGTTTGAACCTTTGCCG ATTTTCTCTTG-3'
LLKKK-18-Bxz2gp12-His-Tag® for	Insertion der Sequenz des Peptides LLKKK-18 und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-AAAAAAGTTTCTACGTAAATTAGTG <u>GGATCC</u> ATGCCGCTCGCTGTTGGC-3'
LLKKK-18-Bxz2gp12-His-Tag® rev		5'-ATGCGTTTAAACAATACGTTTAAACTCCTT <u>CATATG</u> TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGG-3'
Bxz2gp12-His-Tag®-LLKKK-18 rev	Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides LLKKK-18 vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CGCATAAAAAAGTTTCTACGTAAATTAGTG <u>CTCGAG</u> TGATGACACCAC-3'
Bxz2gp12-His-Tag®-LLKKK-18 for		5'-TTTAACAATACGTTTAAACTCCTT <u>CTTAAG</u> GTGATGGTGGTGGTGATG-3'
PK-D29gp12-His-Tag® for	Insertion der Sequenz des Peptides PK und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-AAACGCAAA <u>GGATCC</u> ATGAGCAAACCGTGGCTG-3'
PK-D29gp12-His-Tag® rev		5'-TTGCGTTTCTTACGCTT <u>CATATG</u> TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC-3'
D29gp12-His-Tag®-PK for	Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides PK vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CGTAAGAAACGCAAAAACGCAAATAG <u>CTCGAG</u> TGATGAGATCCG-3'
D29gp12-His-Tag®-PK rev		5'-CTT <u>CTTAAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTGATCTGACGCAGAAACTC-3'
pK34-D29gp12-His-Tag® for1	Erste PCR Reaktion zur Insertion der Sequenz des Peptides pK34 und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CGCGAAGTCACGGGACTGGCACGGAATGTGAGCAAACCGTGGCTG TTC-3'
pK34-D29gp12-His-Tag® rev1		5'-GCCGTGCACTTTAGTCTCAATAACGCGCGG <u>CATATG</u> TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC-3'
pK34-D29gp12-His-Tag® for2	Zweite PCR Reaktion zur Insertion der Sequenz des Peptides pK34 und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-GCAAAACGGTGGATCAAA <u>GGATCC</u> AGCAAACCGTGGCTGTTTC-3'
pK34-D29gp12-His-Tag® rev2		5'-CAGGCGGTCCACGTTTTCTTCGCTCACATTCCGTGCCAGTCC-3'
D29gp12-His-Tag®-pK34 for1	Erste PCR Reaktion zur Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides pK34 vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-GGCCGCGAAGTCACGGGACTGGCACGGAATGTG <u>CTCGAG</u> TGATGACACCAC-3'
D29gp12-His-Tag®-pK34 rev1		5'-GTGCACTTTAGTCTCAATAACGCGCGG <u>CTTAAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTG-3'

D29gp12-His-Tag®-pK34 for2	Zweite PCR Reaktion zur Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides pK34 vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CTGGCAAAACGGTGGATCAAA <u>CTCGAG</u> TGATGACACCAC-3'
D29gp12-His-Tag®-pK34 rev2		5'-GCGGTCCACGTTTTCTTCGCTCACATTCCGTGCCAGTCC-3'
SMAP-29-D29gp12-His-Tag® for1	Erste PCR Reaktion zur Insertion der Sequenz des Peptides SMAP-29 und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-ATCCGCATCGCTGGT <u>GGATCC</u> ATGAGCAAACCGTGGCTG-3'
SMAP-29-D29gp12-His-Tag® rev1		5'-AATGCGCAGCACGGTCGGGCC <u>CATATG</u> TATATCTCCTTCTTAAAGT-3'
SMAP-29-D29gp12-His-Tag® for2	Zweite PCR Reaktion zur Insertion der Sequenz des Peptides SMAP-29 und folgend einer BamHI Schnittstelle nach der NdeI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-AATTGCGCACGGCGTCAAAAAATACGGCCCGACCGTGCTGC GC-3'
SMAP-29-D29gp12-His-Tag® rev2		5'-TTGCGACCCAGGCGACGACGACACCG <u>CATATG</u> TATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATT GTTATCCGC-3'
D29gp12-His-Tag®-SMAP-29 for1	Erste PCR Reaktion zur Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides SMAP-29 vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CTGCGTCGCCTGGGTGCGAAAAATTGCGCAC <u>CTCGAG</u> TGATGAGATCCG-3'
D29gp12-His-Tag®-SMAP-29 rev1		5'-ACCACG <u>CTTAAG</u> ATGGTGATGGTGATGGTGGATCTGACGCAGAACTC-3'
D29gp12-His-Tag®-SMAP-29 for2	Zweite PCR Reaktion zur Insertion einer AflII Schnittstelle und folgend der Sequenz des Peptides SMAP-29 vor der XhoI Schnittstelle per Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	5'-CTGCGCATTATCCGCATCGCTGGTTAG <u>CTCGAG</u> TGATGAGATCCG-3'
D29gp12-His-Tag®-SMAP-29 rev2		5'-CACGGTCGGGCCGTATTTTTGACGCCGTGCGCAATTTGCGA CC-3'

Tabelle A 2: *Primer-Sequenzen und Beschreibungen ausgewählter Primer*

Die Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichen hervorgehoben.

Anhang 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Lysine

Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen der verwendeten Lysine dargestellt:

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
Bxz2gp11-H	MTEKVLPHYDRSIVTQETGWWCGPAATQVVLNSRGIIVPEATLAAEIAIENPGRGDDRDGTDYVGLIEQVLDRRVPQARYTSVYLTNDPPTQAQKDRLEWHIVRSINAGYGVVMNWVAPP SNKPRGVKGSVSPRYSGGTTYHYVACMGYDDTPGARAVWIADSGFQPGGYWISFDQCATLIPPKGYAYADAAPAAPAPAPT PVVDAAPILARAAGISEAKAREILPTMRDGLKQADCTTVNRIAMFIAQTGHESD DFRATEEYANGPLDQERWIYKGRTWIQTWREHYARFGKWCDFRGLVTDPDV FVKNPRLADLKWAGIGAAWYWTVERPDINALCDRRDIETVSRRINGTNPNTGRANHIEERARWNRALAVGDDLLQLIREEDGFLSALTPAEQRALYNEIMKKGPTRSFMAEDQN QIETLLGFVYNIDGNIWINDAVTRAYLFDVPLAVEYVERVARDGVHPKSWAFQQLDGKGERWLAKFGQEYCKGLIRFKKKLNDLLEP YGENHHHHHHHLE
H-Bxz2gp11ΔCBD	MHHHHHHHMTTEKVLPHYDRSIVTQETGWWCGPAATQVVLNSRGIIVPEATLAAEIAIENPGRGDDRDGTDYVGLIEQVLDRRVPQARYTSVYLTNDPPTQAQKDRLEWHIVRSINAGYGVVMNWVAPP SNKPRGVKGSVSPRYSGGTTYHYVACMGYDDTPGARAVWIADSGFQPGGYWISFDQCATLIPPKGYAYADAAPAAPAPAPT PVVDAAPILARAAGISEAKAREILPTMRDGLKQADCTTVNRIAMFIAQTGHESD DFRATEEYANGPLDQERWIYKGRTWIQTWREHYARFGKWCDFRGLVTDPDV FVKNPRLADLKWAGIGAAWYWTVERPDINALCDRRDIETVSRRINGTNPNTGRANHIEERARWNRALAVGDDLLQLIREEDGFLSALTPAEQRALYNEIMKKGPTRSFMAEDQN QIETLLGFVYNIDGNIWINDAVTRAYLFDVPLAVEYVERVARDGVHPKSWAFQQLDGKGERWLAKFGQEYCKGLIRFKKKLNDLLEP YGENHHHHHHHLE
Bxz2gp12-H	MPLRVGSNDANTGGLVSRWQKTM LARYAAYAKAYDGGPLRVDGYFGYDDADVQREYERTRHQVVDGEVSDADLRALGLEAAKRWLFTVHGTGQADPLGPGLPADTARAVLDKYTWQPIGNYPARAFPMWSSIMDGARELSQIASKSGEVNLAGYSQGA VVVGQVLKHDIMDPKGSLLHRLGDVRKVVWLGPNMRQRGIAHFDEWIHPVAGPDSYGILDDRLEGLEKAPFEIRDYAHAGDMYASITDGD KDEYKIAICKIVMTATDFYRGPNSVSVQLIELGQRPLTEGIAMALAIIDTLRFFNTAHGYNIGPAIDFLRSHHHHHHLE
D29gp10-H	MTLIVTRDHAQVWVHDMCRARAGNRYGYGGAFTLNPRDITDCSGLVLQTAAWYGGGRKDWIGNRYGSTESFRLDHKIVYDLGFRRLPPGGVAALGFTPVMVLVGLQHGGGGGRYSHTACTLMTMDIPGGPVKVSQRGVDSWESRGEVNGVGVFLYDGARAWN DPLHDFWYLDKLEDDGPTQSDVAAEILARATGLAYNRAVALLPAVRDGLIQADCTNPNRIAMWLAQIGHESDDFKATAEYASGDAYDTRTD LGNTPEVDGDRGLYKGRSWIMITGKDNRYDFS RWAHGRGLVPTPDYFV VHPLELSELRWAGIGAAWYWTVERPDINALSDRRDL ETVTRRINGGLTNLDDRRRRYNLALAVGDQLLLIGDDDELADPTIQRFIIEHGALFNTVVTQSPYGDQPNPDGSEPRSNLWQLHE LIKNGDGMGHARYVEESARAGDLRELERVVRRAAKGLGRDRSPEFIARARNVLAQIEAANPEYLQAYIARNGALHHHHHHHLE
H-D29gp10ΔCBD	MHHHHHHHMTLIVTRDHAQVWVHDMCRARAGNRYGYGGAFTLNPRDITDCSGLVLQTAAWYGGGRKDWIGNRYGSTESFRLDHKIVYDLGFRRLPPGGVAALGFTPVMVLVGLQHGGGGGRYSHTACTLMTMDIPGGPVKVSQRGVDSWESRGEVNGVGVFLYDGARAWN DPLHDFWYLDKLEDDGPTQSDVAAEILARATGLAYNRAVALLPAVRDGLIQADCTNPNRIAMWLAQIGHESDDFKATAEYASGDAYDTRTD LGNTPEVDGDRGLYKGRSWIMITGKDNRYDFS RWAHGRGLVPTPDYFV VHPLELSELRWAGIGAAWYWTVERPDINALSDRRDL ETVTRRINGGLTNLDDRRRRYNLALAVGDQLLLIGDDDELADPTIQRFIIEHGALFNTVVTQLE
D29gp12-H	MSKPWLFTVHGTGQPDPLGPGLPADTARDVLDIYRWQPIGNYPAAAFPMWPSVEKGVAEILILQIELKLADADPYADFAMAGYSQGAIVVGQVLKHHILPPTGRLHRLHRLKVKVIFWGNPNMRQKGFASDEWIHPVAAPDTLGILEDRLENLEQYGFVDRDYAHDGDMYASIKEDDLHEYEVAIGRIVMKASGFIGGRDSVVAQLIELGQRPIEGIALAGAIIDALTFFARSRMGDKWPHLYNRYPAVEFLRQHHHHHHHLE
L5gp10-H	MTFTVTRERAQVWVHDMARARDGLPYAYGGAFTNPNRVSTDCSGLVLQTAAWYGGGRDWDVGNRYGSTESFRLDHKIVYDLGFRRLPPGGVAALGFTPVMVLVGLQHGGGGGRYSHTACTLMTMDHPGGPVKMSDRGVDSWESHGNGRNGVGVELYEGARAWN DPLHDFWYLDKLEDDGPTQSDVAAEILARATGLAYNRAVALLPAVRDGLIQADCTNPNRIAMWLAQIGHESDDFKATAEYASGDAYDTRTD LGNTPEVDGDRGLYKGRSWIMITGKDNRYDFS RWAHGRGLVPTPDYFV VHPLELSELRWAGIGAAWYWTVERPDINALSDRRDL ETVTRRINGGLTNLDDRRRRYNLALAVGDQLLLIGDDDELADPTIQRFIIEHGALFNTVVTQLE
L5gp12-H	MSKPWLFTVHGTGQPDPLGPGLPADTARDVLDIYRWQPIGNYPAAAFPMWPSVEKGVAEILILQIELKLADADPYADFALAGYSQGAIVVGQVLKHHIINPRGRLHRLHRLKVKVIFWGNPNMRQKGFASHTDEWIHQVAASDTMGILEDRLENLEQYGFVDRDYAHDGDMYASIKEDDMHEYEVAIGRIVMSARRFIGGKDSVIAQLIELGQRPIEWEGIAMARAIIDALTFFAKSTQGPSWPHLYNRYPAVEFLRRIHHHHHHHLE
TM4gp29-H	MSFTRFLQDDPLLTREQVMAELIRVADELNMPDKRGACVIAGMTISQEVGVKDNPPFERRFWCPANRADPESFNYPHDSSENDGRSVGYFQQQKGPNGELWWGTTASEMNLHSAATQFMTRLKAAGYNASNAQAANDSAQAIQSGVPQAYKQWWDINRLYDKVKGSGGGPAPAPKPPQSGPWTGDPVWLADVLRAEGLNVVELPGWLDRGHGDMGRLWGVVCHHTGSDNTPSSEIAFHPSLGLCSQIHLARNGTVTLGCVGIAWHAGVGSYPGLPEDNANAVTIGIEAQNSGTYDGAPHRNTNWPDAQYDAYVKKCAICRRLGVRADHVISHKEWAGRKGQKWDPGAIMDNIFRADVQRRIDAHQPNGEDDFMAALSADQREVNLNLRVLADRRFVSFPFRHLGEGPSE TVAGFGLNTDGLNHAQYTIELARLGDPTHLALLREVASAEGDSRYPDRQYDAKLAKRVLAIEGAATAKAPKSTPSAPTEPAPEAPT PPVKAACALSAAGCVVAGSTSGGGCALSTDGTGKCVTAATDGGAAHHHHHHHLE
H-TM4gp29ΔCBD	MHHHHHHHMSFTRFLQDDPLLTREQVMAELIRVADELNMPDKRGACVIAGMTISQEVGVKDNPPFERRFWCPANRADPESFNYPHDSSENDGRSVGYFQQQKGPNGELWWGTTASEMNLHSAATQFMTRLKAAGYNASNAQAANDSAQAIQSGVPQAYKQWWDINRLYDKVKGSGGGPAPAPKPPQSGPWTGDPVWLADVLRAEGLNVVELPGWLDRGHGDMGRLWGVVCHHTGSDNTPSSEIAFHPSLGLCSQIHLARNGTVTLGCVGIAWHAGVGSYPGLPEDNANAVTIGIEAQNSGTYDGAPHRNTNWPDAQYDAYVKKCAICRRLGVRADHVISHKEWAGRKGQKWDPGAIMDNIFRADVQRRIDAHQPNGEDDFMAALSADQREVNLNLRVLADRRFVLE
TM4gp30-H	MAWVGWQLGMQGEQVKVIQKLIQYQWVRDRYPRLTASGVYDVNTQAAIVEFQFRAGLPVTGIADYATQVRLGAVAPAPPPRQIMVLVTFSGTSADMWGTYPADVARALDPSIFYWQPVYCGPNPFIAPMGSSAKSGEVEGLRLLEKARDFDYIVLIGYSQGALPASRLMRRILSGDLQRFSKLIAGVTFGNPMREKGHFTFGGADPGGHLDPQCLVNTPDWVWHDYAAKGDYITVSGSGSNDKANADMTFIYQLVQGDILGMMFGTGNPLDILGLLGGGLLGGGGLLGGGGLQLPSGLVLPVGVQGGALTDHQRGLVEAVLALANPFAEVPAAVKAIVSGVGIATNPPTAPHIEYHIREAAPGVTFYQHAIDYLRQVGASVAAAHHHHHHLE

Tabelle A 3: Aminosäuresequenzen der verwendeten Lysine

Der His-Tag ist fett hervorgehoben, die durch die XhoI Schnittstelle codierten Aminosäuren sind *kursiv* angezeigt.

Anhang 4: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der verwendeten antimikrobiellen Peptide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Aminosäuresequenz	Referenz
LL-37	CTCCTGGGTGACTTCTTTGCAAAT CCAAAGAGAAAATCGGCAAAGAGT TCAAACGTATCGTGCAGCGCATTAA AGACTTTCTGCGTAACCTGGTCCG CGTACCGAATCT	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ RIKDFLRNLVPRTES	(Teng T. <i>et al.</i> , 2015)
LLKKK-18	AAGGAGTTTAAACGTATTGTTAAAC GCATAAAAAAGTTTCTACGTAAATT AGTG	KEFKRIVKRIKKFLRKLIV	
PK	AAGCGTAAGAAACGCAAAAACGC AAA	KRKKRKKRK	(Briers Y. <i>et al.</i> , 2014b)
pK-34	CCGCGCGTTATTGAGACTAAAGTGC ACGGCCGCGAAGTCACGGGACTGG CACGGAATGTGAGCGAAGAAAACG TGGACCGCCTGGCAAAACGGTGGA TCAAA	PRVIETKVHGREVTGLARNVSE ENVDRILAKRWIK	(Teng T. <i>et al.</i> , 2015)
SMAP-29	CGTGGTCTGCGTCGCCTGGGTCGCA AAATTGCGCACGGCGTCAAAAATA CGGCCCCGACCGTGCTGCGCATTATC CGCATCGCTGGT	RGLRRLGRKIAHGVKKYGPTV LRIIRIAG	(Bagella L. <i>et al.</i> , 1995)

Tabelle A 4: Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der verwendeten AMPs

Anhang 5: Mutagenesevarianten von D29gp12

In der Abbildung ist die wildtypische D29gp12-H Aminosäuresequenz dargestellt und die bei den Mutagenesevarianten veränderten Residuen sind markiert und wiedergegeben.

```

MSKPWLFTVH GTGQPDPLGP GLPADTARDV LDIYRWQPIG NYPAAAFPMW 50
. . . . . M . . . . . 50
PSVEKGV AEL ILQIELKLDA DPYADFAMAG YSQGAIVVGQ VLKHHILPPT 100
. . . . . M . . . . . M . . . . . Y . . . . . 100
GRLHRFLHRL KKVIFWGNPM RQKGF AHSDE WIHPVAAPDT LGILEDRL EN 150
. . . . . Y . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 150
LEQYGFEVRD YAH DGD MYAS IKEDDLH EYE VAIGRIVMKA SGFIGGRDSV 200
. . . . . M M . . . . . Y . . . . . X . . . . . 200
VAQLIELGQR PITEGIALAG AIIDALTTFFA RSRMGDKWPH LYNRYPAVEF 250
. . . . . I . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 250
LRQIH HHHHHH LE 262
. . . . . . . . . . . 262

```

Abbildung A 1: D29gp12-H Aminosäuresequenz und der veränderten Residuen

Die bei der Mutagenese veränderten Residuen sind grau hinterlegt. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code wiedergegeben und X steht hier für die Aminosäuren A, I, L, M, P oder V.

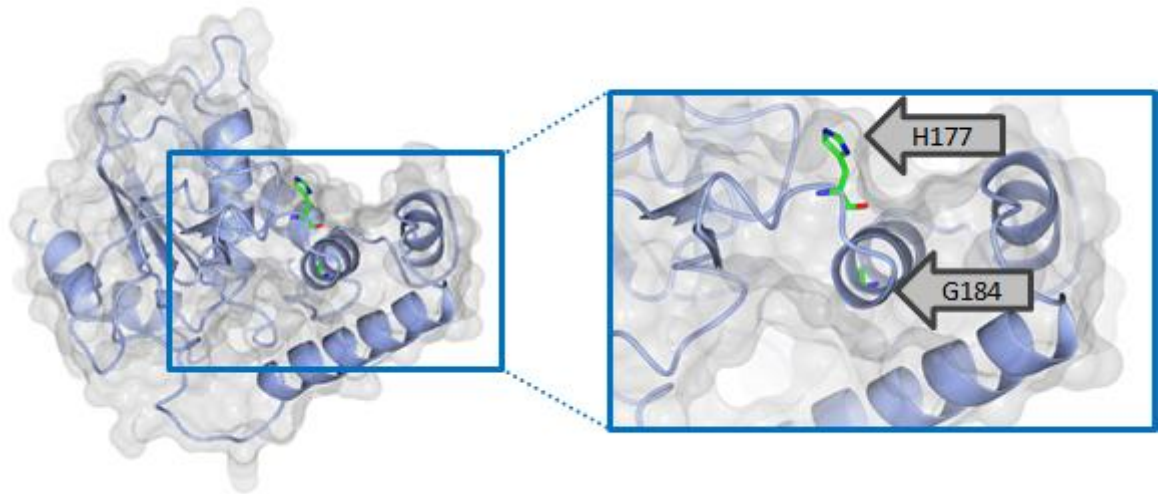
Anhang 6: Residuen H₁₇₇ und G₁₈₄ in der Kristallstruktur des Lysins B D29gp12

Abbildung A 2: Darstellung der aus den Mutageneseuntersuchungen erhaltenen Residuen mit stabilisierendem Effekt

Es wurde die in der PDB unter 3HC7 abgelegte Kristallstruktur von D29gp12 (Payne K. *et al.*, 2009) für die Erstellung der Graphik verwendet. Die Aminosäuren H177 und G184 sind im Zylindermodell hervorgehoben und sind in der Vergrößerung mit Pfeilen markiert.

[illegible]

Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben Code angegeben. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position der AS in der Sequenz des zugehörigen Proteins. Dargestellt ist die Sequenzidentität als Übergang von Blau (0 %) zu Rot (100 %) als *Alignment* und als Graphik der Konservierung (*Conservation*).

Aus dem *Alignment* wurden die paarweisen Sequenzidentitäten der Lysine A bestimmt.

Prozentuale Sequenzidentität				
Lysin B	Bxz2gp11	D29gp10	L5gp10	TM4gp29
Bxz2gp11	100 %	33 %	12 %	11 %
D29gp10	33 %	100 %	41 %	12 %
L5gp10	12 %	41 %	100 %	13 %
TM4gp29	11 %	12 %	13 %	100 %

Tabelle A 5: Sequenzidentitäten der Lysine A im direkten Vergleich

	Bx2g2p12	D29gp12	L5gp12	Ms5gp3	TM4gp30	
	MPLRVGSNDANTGGLVSRWQKTMRLARYAAYAKAYDGGPLRVDDGYFYDDADVQREYERRTHQVVDGEVSDADLRA	M-----	M-----	M-----	M-----	75
	D29gp12	M-----	M-----	M-----	M-----	1
	L5gp12	M-----	M-----	M-----	M-----	1
	Ms5gp3	MRIR--	MRIR--	MRIR--	MRIR--	70
	TM4gp30	MA-VVVGWQLGMQGGEQVKVIQKQLIAKYQWVRDRY--	MA-VVVGWQLGMQGGEQVKVIQKQLIAKYQWVRDRY--	MA-VVVGWQLGMQGGEQVKVIQKQLIAKYQWVRDRY--	MA-VVVGWQLGMQGGEQVKVIQKQLIAKYQWVRDRY--	61
Conservation						
	Bx2g2p12	LGLEA-----	LGLEA-----	LGLEA-----	LGLEA-----	131
	D29gp12	-----	-----	-----	-----	52
	L5gp12	-----	-----	-----	-----	52
	Ms5gp3	GIIINAETKYVMGYLSRPVIDTRPVLFTVCGTGVVWVWVGPD-	GIIINAETKYVMGYLSRPVIDTRPVLFTVCGTGVVWVWVGPD-	GIIINAETKYVMGYLSRPVIDTRPVLFTVCGTGVVWVWVGPD-	GIIINAETKYVMGYLSRPVIDTRPVLFTVCGTGVVWVWVGPD-	138
	TM4gp30	TGIDYATQVRLGAVAPAPP--	TGIDYATQVRLGAVAPAPP--	TGIDYATQVRLGAVAPAPP--	TGIDYATQVRLGAVAPAPP--	136
Conservation						
	Bx2g2p12	IMDGARELRSQI--	IMDGARELRSQI--	IMDGARELRSQI--	IMDGARELRSQI--	201
	D29gp12	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFAMAGYSQGAIVVGQVLKHHILPPTGR	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFAMAGYSQGAIVVGQVLKHHILPPTGR	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFAMAGYSQGAIVVGQVLKHHILPPTGR	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFAMAGYSQGAIVVGQVLKHHILPPTGR	127
	L5gp12	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFALAGYSQGAIVVGQVLKHHILNPRGR	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFALAGYSQGAIVVGQVLKHHILNPRGR	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFALAGYSQGAIVVGQVLKHHILNPRGR	VEKGVAELILQIELKLDADPYADFALAGYSQGAIVVGQVLKHHILNPRGR	127
	Ms5gp3	ITAGITEAHNQANRWRRRIETHGTA	ITAGITEAHNQANRWRRRIETHGTA	ITAGITEAHNQANRWRRRIETHGTA	ITAGITEAHNQANRWRRRIETHGTA	213
	TM4gp30	AKSGEVEGLRLLDEK--	AKSGEVEGLRLLDEK--	AKSGEVEGLRLLDEK--	AKSGEVEGLRLLDEK--	206
Conservation						
	Bx2g2p12	FDEWIHPVAGPDSYGILDDRLEGLEKAPFERDYAHAGDMYASITDGDKEEYKIA--	FDEWIHPVAGPDSYGILDDRLEGLEKAPFERDYAHAGDMYASITDGDKEEYKIA--	FDEWIHPVAGPDSYGILDDRLEGLEKAPFERDYAHAGDMYASITDGDKEEYKIA--	FDEWIHPVAGPDSYGILDDRLEGLEKAPFERDYAHAGDMYASITDGDKEEYKIA--	261
	D29gp12	SDEWIHPVAAPODTLGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	SDEWIHPVAAPODTLGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	SDEWIHPVAAPODTLGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	SDEWIHPVAAPODTLGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	187
	L5gp12	TDEWIHQVAASDTMGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	TDEWIHQVAASDTMGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	TDEWIHQVAASDTMGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	TDEWIHQVAASDTMGILEDRLLENLEQYGFVEVDYAHGDMYASIKEDDMHEYEVA--	187
	Ms5gp3	ADHGGSGMAPSNTQGVSSNGMRNTPDW--	ADHGGSGMAPSNTQGVSSNGMRNTPDW--	ADHGGSGMAPSNTQGVSSNGMRNTPDW--	ADHGGSGMAPSNTQGVSSNGMRNTPDW--	270
	TM4gp30	PGG-----	PGG-----	PGG-----	PGG-----	272
Conservation						
	Bx2g2p12	--MTATDFYRG--	--MTATDFYRG--	--MTATDFYRG--	--MTATDFYRG--	293
	D29gp12	--MKASGFIFG--	--MKASGFIFG--	--MKASGFIFG--	--MKASGFIFG--	219
	L5gp12	--MSARRFIFG--	--MSARRFIFG--	--MSARRFIFG--	--MSARRFIFG--	219
	Ms5gp3	--RDLDLFT-G--	--RDLDLFT-G--	--RDLDLFT-G--	--RDLDLFT-G--	301
	TM4gp30	GNPLDILGLLGG	GNPLDILGLLGG	GNPLDILGLLGG	GNPLDILGLLGG	347
Conservation						
	Bx2g2p12	LAIIDTLRFFNTAHG--	LAIIDTLRFFNTAHG--	LAIIDTLRFFNTAHG--	LAIIDTLRFFNTAHG--	321
	D29gp12	GAIIDALTFFARSRMGDKWPHL-YNR--	GAIIDALTFFARSRMGDKWPHL-YNR--	GAIIDALTFFARSRMGDKWPHL-YNR--	GAIIDALTFFARSRMGDKWPHL-YNR--	254
	L5gp12	RAIIDALTFFAKSTGQPSWPHL-YNR--	RAIIDALTFFAKSTGQPSWPHL-YNR--	RAIIDALTFFAKSTGQPSWPHL-YNR--	RAIIDALTFFAKSTGQPSWPHL-YNR--	254
	Ms5gp3	RAILDAGMFFAKRTG--	RAILDAGMFFAKRTG--	RAILDAGMFFAKRTG--	RAILDAGMFFAKRTG--	332
	TM4gp30	KATVSGVGFI--	KATVSGVGFI--	KATVSGVGFI--	KATVSGVGFI--	400
Conservation						

Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben Code angegeben. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position der AS in der Sequenz des zugehörigen Proteins. Dargestellt ist die Sequenzidentität als Übergang von Blau (0 %) zu Rot (100 %) als Alignment und als Graphik der Konservierung (*Conservation*).

Anhang 9: Ermittlung einer geeigneten Proteinmolarität für die Bestimmung der antimykobakteriellen Aktivität mit dem Standard-Aktivitätstest

Standard-Aktivitätstest: Bestimmung der KBE-Reduktion			
Protein		Log ₁₀ Reduktion der KBE nach 20 h Ink. bei RT	
		<i>M. smegmatis</i> SMR5	<i>M. fortuitum</i>
D29gp12	1 µM	4,4 ± 1,6	1,4
	2 µM	4,6 ± 0,9	1,2
	3 µM	5,6 ± 0,4	1,6
	4 µM	5,2 ± 0,8	1,9
	5 µM	6 ± 0,0	2,2

Tabelle A 6: Standard-Aktivitätstest für die Optimierung der verwendeten Molarität für die KBE Reduktion auf *M. smegmatis* SMR5 und *M. fortuitum*

Das Detektionslimit lag bei 6 log₁₀ Reduktion und die erhaltene Standardabweichung der Log₁₀ Reduktionswerte wurde als Fehler angegeben, wobei für *M. smegmatis* SMR5 n = 2 und für *M. fortuitum* n = 1 betrug.

Anhang 10: MIC-Werte verschiedener Endolysine und Lysine A

Die MIC-Werte der Lysine A D29gp10, TM4gp29, Ms6gp2 und BTCU-1_ORF7, der auf TM4gp29 basierenden Artily sine A und der Endolysine LysH5, LysK, PlyC, PlyP und PlySs2 sind in der folgenden Tabelle A 7 wiedergegeben:

MIC-Werte verschiedener Endolysine und Lysine A					
		MIC in [µg/ml] in [µM]		Organismus	Referenz
Lysine A	D29gp10-H	> 55,9	> 1	<i>M. smegmatis</i> SMR5 <i>M. smegmatis</i> DSM 43468	siehe 3.4.5.
	TM4gp29-H	> 59,7	> 1		
	<i>TM4gp29-H-PK</i>	> 61,1	> 1		
	<i>TM4gp29-H-pK34</i>	> 63,8	> 1		
	<i>PK-TM4gp29-H</i>	> 61,3	> 1		
	<i>pK34-TM4gp29-H</i>	> 64,0	> 1		
	Ms6gp2	> 500	> 11,6	<i>M. smegmatis</i> , <i>M. tuberculosis</i>	(Mahapatra S. <i>et al.</i> , 2013)
	BTCU-1 ORF7	> 80	> 1,3	<i>M. smegmatis</i> ATCC 14468	(Lai M. J. <i>et al.</i> , 2015)
Endolysine	LysH5	-	0,05 - 0,1	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>	(Gutierrez D. <i>et al.</i> , 2014)
	LysK	35,6	0,6	<i>S. aureus</i>	(Mao J. <i>et al.</i> , 2013)
	PlyC	0,02	0,175	<i>S. pyogenes</i>	(Shen Y. <i>et al.</i> , 2013)
	PlyPy	64	2,3	<i>S. pyogenes</i>	(Lood R. <i>et al.</i> , 2014)
	PlySs2	8	-	<i>L. monocytogenes</i>	(Gilmer D. B. <i>et al.</i> , 2013)
		256 - 512	-	<i>S. agalactiae</i>	
		16 - 32	-	<i>S. aureus</i> MRSA	
		128	-	<i>S. pyogenes</i>	

Tabelle A 7: Vergleich der MIC-Werte verschiedener Endolysine und Lysine A

Lysine A sind grau hinterlegt und Artily sine A sind kursiv hervorgehoben. -: Es wurden keine entsprechenden Werte publiziert bzw. konnten nicht aus den publizierten Daten berechnet werden. >: die angegebene Konzentration bzw. Molarität war die maximal getestete.

Anhang 11: Effekt der weiteren Zugabe von 0,05 % v/v Tween 80 bzw. 0,002 % v/v Triton X-100 auf die *in vitro* Aktivität des Lysins B D29gp12

Für die Untersuchung des Einflusses der weiteren Detergenzienzugabe auf die *in vitro* Aktivität des Lysins B D29gp12 wurde der Versuchsaufbau wie bei den MIC Experimenten (siehe 2.2.8.4.) gewählt, wobei dem 7H9-Medium das Substrat im Überschuss (circa 0,66 mM) zugesetzt wurde. Zudem wurde die Proteinlösung mit der entsprechenden Detergenzmenge versetzt, um die angegebenen Mengen im Ansatz zu erhalten. Die Detektion des Substratumsatzes und die Auswertung der Messungen erfolgte wie für den Esterase-Aktivitätstest beschrieben.

Steigerung der *in vitro* Aktivität des Lysins B D29gp12 durch die weitere Detergenzzugabe

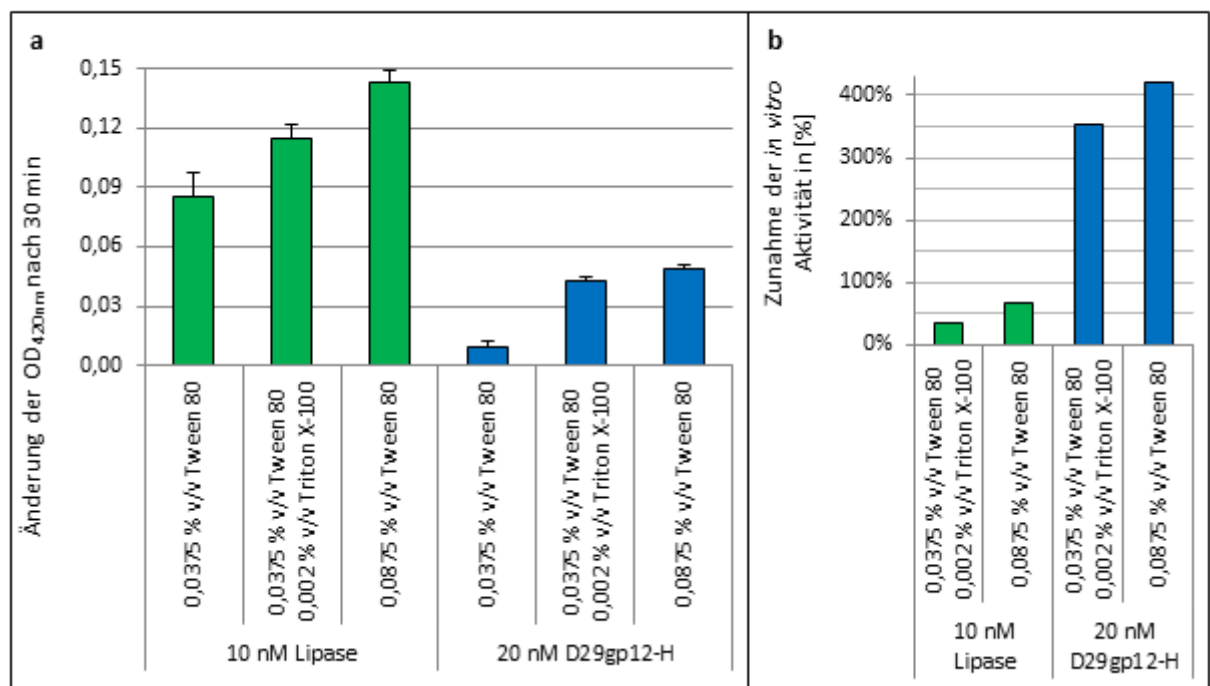


Abbildung A 5: Esterase-Aktivitätstest für die Bestimmung des Einflusses der Zugabe von 0,05 % v/v Tween 80 bzw. 0,002 % v/v Triton X-100 auf die enzymatische Aktivität des Lysins B D29gp12 auf das Substrat 4-Nitrophenylacetat

Die wiedergegebenen Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar, wobei $n = 3$ betrug. Lipase (*P. fluorescens*) wurde als Vergleichsenzym verwendet.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die zum guten Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Reinhard Sterner für seine Unterstützung, für die zahlreichen guten Diskussionen, die stets offene Tür für meine Fragen und natürlich für die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Auch meinem Mentor Prof. Dr. Rainer Merkl danke ich für die Unterstützung und Hilfe, nicht nur bei bioinformatischen Problem, und die vielen guten Ratschläge.

Im Besonderen möchte ich Dr. Stefan Miller, Dr. Manfred Biebl und allen anderen in der Lisando GmbH nicht nur für das komplexe und unglaublich spannende Thema meiner Doktorarbeit und die Anstellung als Doktorand, sondern vor allem für die ständige Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und für das großartige Arbeitsklima danken. Gerade die zahlreichen Diskussionen über die vielfältigen Herausforderungen meines Projekts oder der anderen Projekte und auch die nichtwissenschaftlichen Gespräche, selbst die über Fußball, haben mich wissenschaftlich und persönlich bereichert und es war ein großes Vergnügen ein Teil des Team Lisando sein zu dürfen.

Herzlicher Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. Hans-Robert Kalbitzer für die Übernahme des Zweitgutachtens und der Prüfung. Auch den anderen Prüfern, Prof. Dr. Reinhard Wirth und Prof. Dr. Christine Ziegler, möchte ich hier für die Übernahme der Prüfung danken.

Auch Prof. Dr. Dr. André Gessner und Dr. Joachim Gläsner möchte ich für die großartige Kooperation danken. Vor allem Joachim gilt mein Dank für die zahlreichen Experimente und die vielen guten Diskussionen über die Ergebnisse und die möglichen Schlussfolgerungen und die potentiellen Verbesserungs- und Anpassungsmöglichkeiten.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Heike Stürer, die so manche Schwierigkeit des Kooperationsprojektes mit mir teilte und mit viel Eifer und Mühe die Untersuchungen der thermischen Stabilisierung der Lysine mittels Mutagenese sehr erfolgreich durchführte.

PD. DR. Reinhard Rachel möchte ich für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie Aufnahmen und die Möglichkeit, selbst an einem Elektronenmikroskop Aufnahmen machen zu können danken.

Hier möchte ich auch Patrick Löffler und Dietmar Birzer für die bioinformatischen Analysen und die Erklärungen und Wiederholungen der Erklärungen der dahinter stehenden Mechanismen und Funktionen danken.

Auch den anderen Mitarbeitern des Biochemie II Lehrstuhls möchte ich herzlich dafür danken, dass ich mich nie nur als Besucher, sondern stets als Teil der Arbeitsgruppe sehen durfte. Auch für die vielen großartigen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen, für die Unterstützung mit Rat und Tat und generell für die tolle Zeit möchte ich mich hier bedanken.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, dass sie mich immer unterstützt und mir immer beisteht, auch gerade dann wenn ich schlecht gelaunt oder unausstehlich bin.

Auch meinen Freunden möchte ich hier dafür danken, dass sie wahre Freunde sind.

„last but not least“ danke ich meiner Julia, dass sie mich immer wieder aufbaut, wenn mich irgendetwas deprimiert, schlechte Tage mit einem Lächeln wegfegt und mich immer glücklich macht.

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Dr. Heike Stüer und Patrick Löffler

Planung und Durchführung der bioinformatischen Vorhersagen für die Optimierung des Schmelzpunktes des Lysin B D29gp12 über Mutagenese (Patrick Löffler). Planung und Durchführung der rekombinanten Produktion und der experimentellen Bestimmung der Schmelzpunkte der designten Varianten mittels CD-Spektroskopie (Heike Stüer).

2. Dr. Joachim Gläsner

Planung und Durchführung der Experimente für die Bestimmung der Reporter-Kopienzahl mittels PMA-basierter PCR-Inhibition und qPCR, für die Quantifizierung der stoffwechselaktiven Zellen mittels Luziferase-basiertem ATP-Nachweis, für den Wachstumsinhibitionsnachweis mittels BactecMGIT 960-System und für die BacLight-Vitalitäts-Zellfärbungen und Fluoreszenzmikroskopie.

3. Prof. Dr. Reinhard Rachel

Herstellung der benötigten Proben-Grids mit den bereitgestellten *Mycobacterium* Proben und Aufnahme der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie-Bilder.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Robert Andreas Fischer